

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Expressão das Iodotironinas Desiodases Tipo 1 e Tipo 2 nas
Neoplasias da Tireóide

Erika Laurini de Souza Meyer

Porto Alegre, Dezembro de 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Expressão das Iodotironinas Desiodases Tipo 1 e Tipo 2 nas
Neoplasias da Tireóide

Tese apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do
título de mestre

Erika Laurini de Souza Meyer

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Porto Alegre, Dezembro de 2002

Dedico este trabalho ao meu pai, *Coronel Lira*, por incentivar e valorizar o conhecimento. Saudades eterna.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, reconheço a importância de muitos que estiveram ao meu lado, tanto cientificamente, quanto afetivamente. Gostaria de expressar que sou muito grata a todos e espero que orgulhem-se deste trabalho estar concluído.

Neste momento, desejo expressar o meu agradecimento individual aqueles que diretamente contribuíram nessa jornada:

À Profa. Dra. Ana Luiza Maia, agradeço por seres realmente uma professora; foi teu o incentivo para meu ingresso na biologia molecular; é exemplar tua constante participação nas atividades docentes; é admirável tua dedicação para a pesquisa; é louvável teu rigor metodológico; e, contudo, não deixas a desejar na amizade e satisfação pelo êxito de teus alunos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, agradeço por ter encontrado tão agradável ambiente de trabalho, caracterizado principalmente pela amizade e fraterno convívio. Em particular, às colegas: Márcia Wagner pelo valioso auxílio no preparo do artigo para publicação e Lenara Golbert por disponibilizar de material complementar para esse estudo.

Ao Prof. Dr. Alceu Migliavacca e a sua equipe cirúrgica, pela importante colaboração na coleta das amostras para o estudo.

Aos bolsistas de iniciação científica, especialmente ao acadêmico José Miguel Dora, pelo imprescindível auxílio na rotina do laboratório e coleta das amostras.

Aos médicos, professores e funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, pela estrutura, apoio e colaboração oferecidos aos seus alunos.

Por fim, quero agradecer o incentivo pela continuidade de meu aprimoramento acadêmico, que me foi feito pelo Prof. Dr. Giuseppe Repetto, chefe do Serviço de

Endocrinologia do Hospital São Lucas da PUC/RS, onde fiz meu curso de Residência Médica.

Aos meus pais, agradeço por todo o amor recebido e o maravilhoso convívio familiar.

Aos demais familiares.

E ao meu marido Bernard Fabio, que por inúmeras razões, me faz uma pessoa muito feliz.

SUMÁRIO

I) Artigo de Revisão: Mecanismos Moleculares e Marcadores de Diferenciação Celular nos Carcinomas Diferenciados da Tireóide

1.1. Resumo	p.2
1.2. Introdução	p.3
1.3. Propriedades funcionais da célula folicular da tireóide	p.4
1.4. Controle do crescimento da célula folicular da tireóide	p.9
1.5. Carcinogênese dos tumores diferenciados do epitélio folicular	p.10
1.6. Fatores de crescimento e seus receptores	p.12
1.7. Marcadores de diferenciação celular nos carcinomas diferenciados da tireóide	p.12
1.8. Referências bibliográficas	p.17

II) Justificativa e Objetivo

p.30

III) Artigo Original: Redução da Expressão das Iodotironinas Desiodases Tipo 1 e Tipo 2 no Carcinoma Papilar da Tireóide

3.1. Resumo	p.32
3.2. Introdução	p.33
3.3. Material e Métodos	p.34
3.4. Resultados	p.36
3.5. Discussão e Conclusão	p.37
3.6. Referências bibliográficas	p.41
3.7. Tabela 1	p.45
3.8. Figuras 1, 2 e 3	p.46-48
3.9. Legenda das figuras	p.49

**IV) Original Paper: Decreased Type 1 and Type 2 Iodothyronine Deiodinases
Expression in Papillary Thyroid Carcinoma**

4.1. Abstract	p.51
4.2. Introduction	p.52
4.3. Materials and Methods	p.53
4.4. Results	p.55
4.5. Discussion and Conclusion	p.56
4.6. References	p.59
4.7. Table 1	p.63
4.8. Figures 1, 2 and 3	p.64-66
4.9. Figure legends	p.67

Mecanismos Moleculares e Marcadores de Diferenciação Celular nos Carcinomas Diferenciados da Tireóide

Erika L. de Souza Meyer e Ana Luiza Maia

Título abreviado: Tumorigênese dos carcinomas diferenciados da tireóide.

Palavras-chave: tumorigênese, carcinoma papilar da tireóide, carcinoma folicular da tireóide, neoplasia, marcadores biológicos da célula folicular

Correspondências: Dra. Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro: Barcelos, 2350

90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: (51)3316-8127; Fax: (51)3332-5188; e-mail: almaia@vortex.ufrgs.br

RESUMO

Os carcinomas diferenciados do epitélio folicular representam mais do que 85% de todos os tumores malignos da tireóide. A maioria destes mantêm as características bioquímicas da célula folicular tireoidiana. As principais proteínas expressas na célula folicular da tireóide; o receptor do TSH (R-TSH), o co-transportador de Na^+/I^- (NIS), a tireoglobulina (Tg) e a tireoperoxidase (TPO) são fundamentais na biossíntese dos hormônios tireoidianos. As 5'-desiodases são enzimas responsáveis pela ativação do T_4 e produção do hormônio biologicamente ativo T_3 na tireóide e nos tecidos periféricos. Vários estudos têm descrito anormalidades na expressão das proteínas R-TSH, NIS, Tg e TPO nos carcinomas diferenciados da tireóide. Pouco tem sido abordado sobre o papel da expressão das 5'-desiodases nas neoplasias da tireóide.

A carcinogênese da tireóide envolve uma série de eventos genéticos e ambientais que alteram o controle do crescimento celular. Dentre os eventos genéticos, destacam-se a ativação de oncogenes (*ras*, *RET/PTC*, *TRK*, *PPAR γ*) e a inativação de genes supressores tumorais (*p53*).

O entendimento da relação entre carcinogênese e diferenciação celular é fundamental para a determinação do fenótipo e do comportamento tumoral, bem como para a definição do prognóstico e da terapêutica dos carcinomas diferenciados da tireóide.

O objetivo deste artigo é revisar os principais aspectos moleculares relacionados à gênese dos carcinomas diferenciados da tireóide, dando ênfase ao papel das proteínas envolvidas na síntese hormonal como marcadores de diferenciação celular.

Os carcinomas da tireóide, apesar de serem as neoplasias malignas mais freqüentes do sistema endócrino, são relativamente raras, representando menos do que 1% de todas as neoplasias humanas (1,2). A prevalência dos carcinomas da tireóide é mais alta em mulheres (5 a 9 casos em 100.000) do que em homens (2 a 4 casos em 100.000) (1). Os carcinomas tireoidianos são classificados de acordo com o tipo histológico em carcinoma papilar, carcinoma folicular, carcinoma medular e carcinoma indiferenciado ou anaplásico. Os carcinomas diferenciados, papilar e folicular, representam mais do que 85% de todos os tipos histológicos. O carcinoma medular, derivado das células C parafoliculares da tireóide, compreende 5 a 10% e o anaplásico ou indiferenciado, 3% de todos os cânceres da tireóide (1,2).

Dentre as formas diferenciadas do epitélio folicular, o carcinoma papilar é o mais freqüente (60 a 80%) e o de melhor prognóstico, com curvas de sobrevida nos tumores restritos à glândula tireóide, que se superpõem às da população geral. Podem apresentar um comportamento biológico variável, desde microcarcinomas indolentes até formas invasivas que determinam metástases à distância. O carcinoma folicular representa 15 a 25% de todos os carcinomas tireoidianos e geralmente possui um comportamento mais agressivo do que o carcinoma papilar, com tendência à disseminação hematogênica para ossos, pulmões, fígado e cérebro. Comparado a pacientes com carcinoma papilar, os pacientes com carcinoma folicular apresentam ao diagnóstico, idade e estágio clínico mais avançados (3,4,5,6).

Em locais com deficiência na ingestão de iodo observa-se um aumento relativo na incidência dos tipos folicular e anaplásico (1,2). Em estudo prévio realizado no Rio Grande do Sul, a incidência do carcinoma folicular foi elevada (49%), o que é esperado para uma região de bócio endêmico (7). No entanto, mais recentemente, observou-se que o carcinoma papilar é o tipo histológico mais freqüente (51,1%), seguido pelo folicular (41,1%), medular (5%) e anaplásico (2,8%) (8). Estes resultados demonstram uma distribuição característica da chamada “fase de transição”, visto que, embora o carcinoma papilar seja o mais freqüente, a prevalência do carcinoma folicular demonstrou-se elevada (relação folicular/papilar: 0,8), indicando a presença ou o reflexo da deficiência prévia de iodo na região.

Embora a maioria dos carcinomas papilares e foliculares da tireóide sejam esporádicos, 5 a 10% podem apresentar um padrão familiar (10,11). Diversas síndromes familiares exibem um aumento na incidência destas neoplasias. São exemplos, a associação de carcinoma papilar da tireóide à síndrome de Gardner, uma

variante da polipose adenomatosa ligada ao cromossoma 5q21, e ao carcinoma papilar renal (CPR), que está relacionado ao cromossoma 1q21 (9,10,11).

A excisão cirúrgica do tumor é o tratamento primário para o carcinoma diferenciado da tireóide. A tireoidectomia total é o procedimento de escolha, devido ao fato dos carcinomas papilares serem, freqüentemente, bilaterais e multifocais (5,6,12). O tratamento com radioiodo (^{131}I) é indicado para ablação de remanescentes tireoidianos pós-cirúrgicos, destruição de focos microscópicos de câncer e tratamento de metástases (5,6,13). Aproximadamente 80% dos pacientes são curados com o tratamento inicial, 15% apresentarão recorrência local e 5 a 10% desenvolverão metástases à distância (5,14,15). A chance de recorrência é maior nos primeiros 5 a 8 anos após o diagnóstico, mas pode ocorrer várias décadas após o tratamento inicial (6,14,15). A taxa de sobrevida em 10 anos para o carcinoma papilar é de aproximadamente 90% e para o carcinoma folicular, em torno de 75% (5).

Propriedades funcionais da célula folicular da tireóide

A célula folicular tireoidiana normal é altamente diferenciada, com propriedades especializadas que determinam a síntese e a secreção dos hormônios tireoidianos. Quatro proteínas principais envolvidas nesta complexa maquinaria são expressas na célula folicular da tireóide: o receptor da tireotrofina (R-TSH), o co-transportador (simporter) Na^+/I^- (NIS), a tireoperoxidase (TPO) e a tireoglobulina (Tg) (16). A biossíntese dos hormônios da tireóide envolve uma seqüência de etapas em que cada uma destas proteínas apresenta papel fundamental. A figura 1 esquematiza as vias de síntese e secreção dos hormônios da tireóide.

A tireotrofina (TSH) é o principal fator que regula a produção e a secreção dos hormônios pela célula folicular da tireóide (17). Todas as ações do TSH ocorrem através da ligação com seu receptor (R-TSH), membro de uma grande família de receptores ligados à proteína G, que está localizado na superfície basal da célula tireoidiana. Os receptores desta família apresentam uma arquitetura molecular característica, com 7 segmentos transmembrana, 3 alças extracelulares, 3 alças intracelulares, 1 porção carboxi-terminal intracelular e 1 porção amino-terminal extracelular que confere a especificidade do ligante (18).

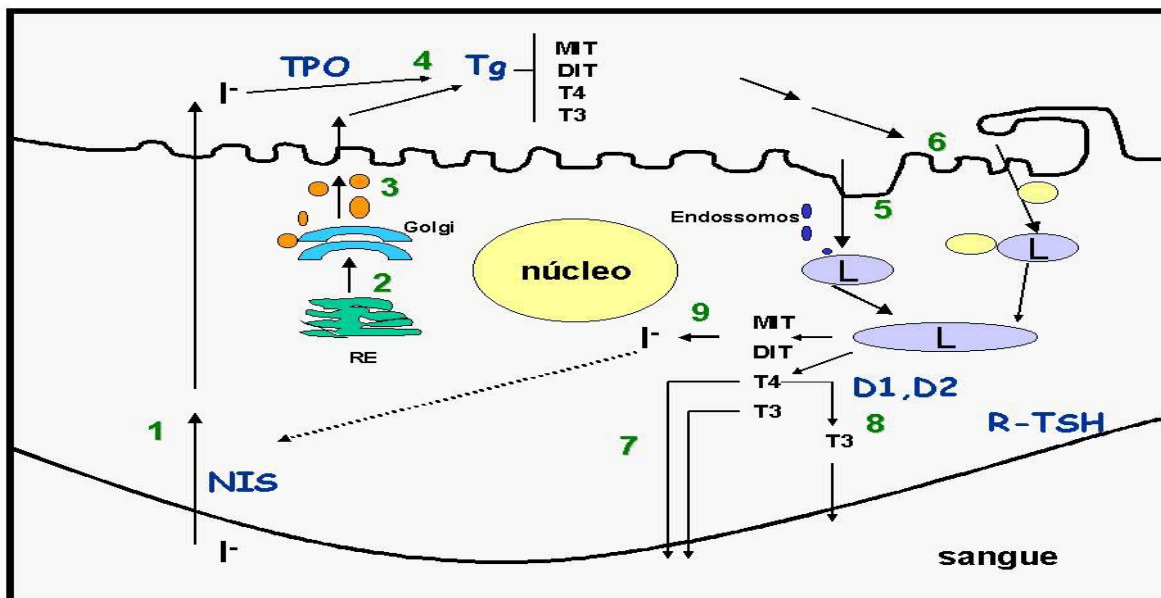


FIGURA 1: Vias de síntese e secreção dos hormônios tireoidianos. (1) Captação do iodeto (I^-) pela célula folicular através do co-transportador Na^+/I^- (NIS). (2) Síntese da tireoglobulina (Tg) no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. (3) Transporte da Tg sintetizada para a superfície apical em pequenas vesículas. (4) Iodinação da Tg e ligação dos precursores iodotirosina (MIT,DIT) para a formação de T_4 e T_3 , mediada pela tireoperoxidase (TPO). (5) Captação da Tg por micropinocitose, passando pelos endossomos e lisossomos (L), onde ocorre a proteólise e secreção hormonal. (6) Captação da Tg em quantidades maiores, formando as vesículas de colóide e passagem direta pelos lisossomos. (7) Liberação do T_4 e T_3 para a corrente sanguínea. (8) Monodesiodação do T_4 em T_3 na célula folicular e secreção do T_3 para a corrente sanguínea. (9) Recirculação do I^- liberado pelo MIT e DIT.

O R-TSH está preferencialmente ligado à sub-unidade α da proteína ligadora guanina-nucleotídeo ($G_s\alpha$), que ativa a adenilciclase e outros efetores, determinando um aumento do AMP cíclico (AMPc). O AMPc promove, conseqüentemente, a ativação da proteína-quinase A (PKA) e leva à consecutiva fosforilação de fatores de transcrição. Esta fosforilação é necessária para ativar a expressão dos genes importantes para a diferenciação fenotípica da célula folicular tireoidiana (18,19,20). O gene do R-TSH está localizado no cromossoma 14q31, possui 10 éxons, sendo que os primeiros 9 éxons codificam a porção longa amino-terminal extracelular (18).

O primeiro passo na biossíntese dos hormônios tireoidianos envolve a captação do iodeto (I^-) pela célula folicular. Este processo é realizado pela proteína NIS, localizada na membrana baso-lateral da célula tireoidiana (21). A proteína NIS faz o co-transporte ativo dos íons sódio (Na^+) e iodeto (I^-) para a porção intracelular, utilizando energia

gerada pela Na^+/K^+ adenosina-trifosfatase (ATPase). O I^- captado pela célula folicular migra para a superfície apical, onde será oxidado pela enzima TPO. A habilidade da glândula tireóide em captar I^- , via NIS, tem feito desta proteína alvo de vários estudos, devido a implicações diagnósticas e terapêuticas (22). Apesar de ser considerada uma proteína específica da célula folicular tireoidiana, a proteína NIS está presente na mucosa gástrica e nas glândulas salivares e mamárias (23). O gene da proteína NIS está localizado no cromossoma 19p13.2 e possui 15 éxons que codificam os 13 segmentos transmembrana da proteína (24). A atividade e a expressão gênica do NIS são estimuladas pelo TSH, via AMPc, no entanto, a sua atividade é bloqueada pelo iodo, independentemente das concentrações de TSH (21).

Além de ser responsável pela oxidação do íon I^- na porção apical da célula folicular, a TPO exerce outras funções importantes na síntese hormonal. No lúmen folicular, será responsável pela catálise da incorporação do I^- aos resíduos tirosil da tireoglobulina (organificação) com formação dos precursores inativos, moniodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A TPO também é responsável pela ligação das moléculas de iodotirosina na tireoglobulina, o que determinará a formação dos hormônios tireoidianos, tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) (16). A TPO é o sítio de ação das drogas antitireoidianas (25) e apresenta um papel imunológico nas doenças auto-imunes da tireóide (26,27). O gene da TPO está localizado no cromossoma 2 e apresenta 17 éxons, sendo que 2 formas de cDNA foram descritas, uma que codifica a proteína de 933 aminoácidos (TPO-1) e outra a proteína de 57 aminoácidos (TPO-2), que apresenta menor atividade enzimática. Ambas proteínas são originadas de um *splicing* alternativo do mesmo gene (28). Tanto a atividade quando a expressão do gene da TPO são regulados pelo TSH (17,18).

A Tg produzida pelo retículo endoplasmático e pela substância de Golgi no citoplasma da célula tireoidiana, é transportada para a superfície apical e depositada no lúmen folicular. Serve como matriz para a síntese e armazenamento dos hormônios da tireóide (16). A Tg é uma macromolécula glicoprotéica de 660 kDa, com 0,1 a 1,0% de seu peso molecular constituído por iodeto. A maior parte deste está nas formas precursoras inativas, MIT e DIT. Cada molécula de Tg contém 5 resíduos de MIT, 4,5 de DIT, 2,5 de T_4 e 0,7 de T_3 (29). A secreção dos hormônios tireoidianos envolve a proteólise da Tg por enzimas lisossômicas e liberação do T_4 e do T_3 para a corrente sangüínea (29). Por ser uma proteína produzida exclusivamente pela célula folicular da tireóide, a dosagem da Tg sérica é considerada um método sensível para a detecção

de recorrência ou metástases em pacientes com carcinomas diferenciados da tireóide (30,31). O gene da Tg está localizado no cromossoma 8q24, apresenta 48 éxons e sua transcrição é regulada principalmente pelo TSH (17,29).

Três fatores de transcrição têm sido implicados na regulação da expressão gênica das proteínas específicas da tireóide: TTF-1 (thyroid transcription factor 1), TTF-2 (thyroid transcription factor 2) e Pax-8 (32). A tireoglobulina parece exercer um efeito contra-regulatório ao TSH, determinando reduções na expressão dos genes específicos da tireóide (Tg, TPO, NIS e R-TSH), devido à inibição da expressão destes fatores de transcrição (33). Estes resultados revelam a importância dos mecanismos de auto-regulação da tireóide.

Oitenta por cento do hormônio secretado pela tireóide está na forma de tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina, T_4), que funciona primariamente como um pró-hormônio para a produção do hormônio tireoidiano biologicamente ativo, a triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina, T_3) (34). A ativação do T_4 ocorre na tireóide e, principalmente, nos tecidos alvo através da ação de enzimas celulares específicas, denominadas iodotironinas desidases tipo I (D1) e tipo II (D2) (35). Aproximadamente 30 a 50% do T_3 secretado diretamente pela tireóide deriva da desidatação intratireoidiana do T_4 (36), sendo que 70 a 90% da produção diária de T_3 origina-se da desidatação do T_4 nos tecidos periféricos (34).

A ativação do T_4 ocorre através da desidatação ou da remoção de um átomo de iodo, do anel fenólico (posição 5') da molécula de T_4 (34,36). Por outro lado, a desidatação do anel tirosínico (posição 5) do T_4 ou do T_3 resulta na formação das iodotironinas inativas T_3 reverso (3,3',5'-triido-L-tironina, rT_3) e T_2 (3,3'-diiodo-L-tironina), respectivamente (figura 2).

As iodotironinas desidases tipo I e tipo II apresentam diferentes características bioquímicas e regulatórias, e exibem diferentes padrões de expressão tecidual, com respostas distintas ao *status* tireoidiano e aos inibidores específicos (35,37,38). A D1, sob condições fisiológicas, desempenha um papel importante na ativação do T_4 , fornecendo a maior parte do T_3 sistêmico (38).

Além de serem expressas em alguns tecidos periféricos, as isoenzimas D1 e D2 são amplamente encontradas na tireóide, participando ativamente do processo de síntese e metabolismo hormonal (38,39). A D1 parece ser constitutivamente expressa e a expressão da D2 varia conforme o grau de estimulação tireoidiana (39).

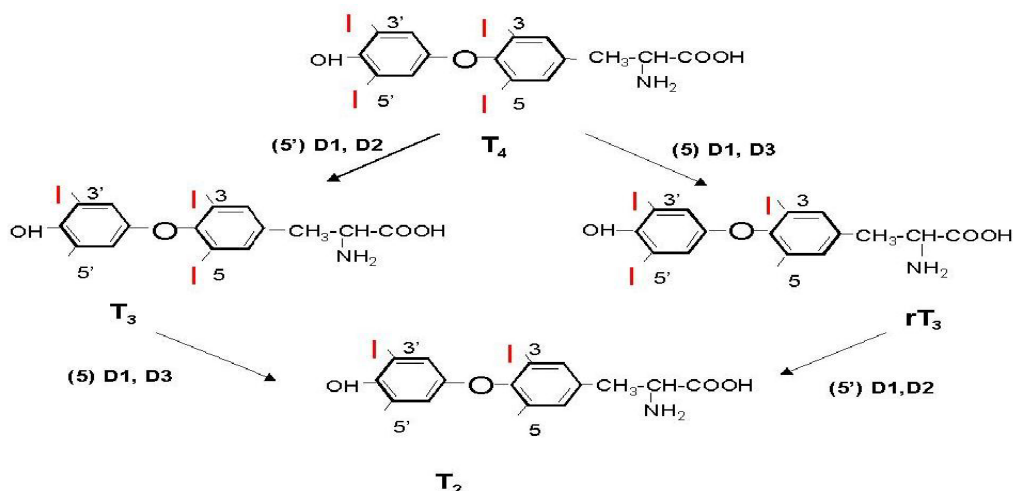


FIGURA 2: Produtos das sucessivas reações de monodesiodação dos anéis externo e interno da tiroxina.

Vários fatores e/ou situações fisiopatológicas podem alterar a atividade e a expressão gênica das desidases na tireóide e nos tecidos periféricos (40). Dentre os vários fatores, de particular importância são os efeitos dos hormônios tireoidianos. No hipotireoidismo, a atividade da D1 e da D3 (desiodase tipo III) estão diminuídas e, da mesma forma, a degradação do T₃ por estas enzimas. Por outro lado, a atividade da D2 está aumentada, preservando os níveis teciduais de T₃. No entanto, em particular na tireóide, as expressões da D1 e da D2 estão aumentadas pelos altos níveis de TSH. No hipertireoidismo, mudanças opostas na atividade das desidases são observadas nos tecidos periféricos (38). Além do estímulo pelo TSH, a expressão da D1 e da D2 na tireóide pode ser estimulada pelas imunoglobulinas na Doença de Graves. Nesta situação, a conversão intratireoidiana do T₄ em T₃, principalmente pela D2, pode contribuir significativamente para o aumento da produção de T₃ pela tireóide (38,39). Enquanto a regulação da D1 pelos hormônios tireoidianos ocorre pela via transcricional (41,42), a regulação da expressão da D2 é um processo mais complexo, que envolve os mecanismos, transcricional e pós-transcricional (37). Ao contrário da D1, a expressão do gene da D2 na tireóide humana está sob o controle do fator de transcrição TTF-1, no entanto, a expressão de ambas isoenzimas não é induzida pelo Pax-8 (43).

Em humanos, o gene da D1 está localizado no cromossoma 1p32-p33 e é composto por 4 éxons que codificam uma proteína de 27kDa (44). O gene da D2 localiza-se no cromossoma 14q24.3 e é composto por 2 éxons separados por um único

íntron de 7,4 kb que codificam uma proteína de 31 kDa (45). A localização subcelular distinta entre a D1, encontrada na membrana plasmática, e a D2, localizada no retículo endoplasmático, próximo ao núcleo, pode explicar a maior participação da D2 na geração do T₃ utilizado localmente (46). Uma outra iodotironina desiodase, a tipo III (D3), apresenta um papel fisiológico de inativação dos hormônios tireoidianos e está expressa principalmente em tecidos fetais e útero (38,40).

Controle do crescimento da célula folicular da tireóide

As concentrações de TSH necessárias para a indução do crescimento da célula tireoidiana normal, são maiores do que as necessárias para a indução das funções diferenciadas, através da via adenilciclase/AMPC (47,48,49). Sinergicamente ao TSH, a insulina ou o *insulin-like growth factor- I* (IGF-I) estão envolvidos na proliferação dos tirócitos normais com manutenção de suas funções especializadas (48). O conceito de que o TSH teria um papel principal, mas não exclusivo, na regulação do crescimento das células foliculares da tireóide, vem sendo revisado (50,51). Assim, fatores de crescimento, como o próprio IGF-I e o *epidermal growth factor* (EGF), podem ter papel importante na regulação do crescimento celular, independentemente do TSH. Os efeitos celulares do EGF, da insulina e do IGF-I são determinados através da ativação da via de transdução da tirosina-kinase (50). Além de sua ação direta sobre o crescimento celular, o TSH pode estimular a expressão de fatores de crescimento e de seus receptores (48,50,51).

Em adição à insulina, IGF-I e EGF, outros fatores de crescimento, como o *platelet-derived growth factor* (PDGF), o *fibroblast growth factor* (FGF) e as citoquinas, estimulam a proliferação celular através da ação sobre a via de transdução da proteína tirosina-kinase, sendo que alguns destes fatores têm efeito autócrino na proliferação. O fator de crescimento *transforming growth factor* β (TGF β) é uma citoquina que apresenta efeito autócrino negativo, inibindo o crescimento celular tireoidiano (48,50). Muitos fatores elaborados pela tireóide, p. ex., IGF-I e FGF, podem ter ação em células endoteliais e fibroblastos, estimulando a neovascularização (52).

Além de diferentes estimuladores e inibidores extracelulares, as vias sinalizadoras intracelulares também são diversas e interrelacionadas. Além da clássica associação do TSH com o sistema da adenilciclase/proteína kinase A (PKA), também ocorre associação com as vias da fosfolipase C (PLC) e da proteína-kinase C (PKC), que

estão implicadas nos sinais de transdução que controlam o crescimento e a função da célula tireoidiana (48,49).

Carcinogênese dos tumores diferenciados do epitélio folicular

A carcinogênese da tireóide é um processo complexo, constituído por uma série de eventos induzidos por fatores genéticos e ambientais que alteram o controle do crescimento celular (53,54). O nódulo bem delimitado, com estrutura claramente distinta do tecido circundante e definido como clonal através da análise genética, é no presente a melhor definição de neoplasia, seja benigna ou maligna (50,55). A maioria dos tumores tireoidianos benignos ou malignos têm origem monoclonal, ou seja, se formam através da expansão clonal de células que sofreram mutações herdadas e/ou adquiridas em genes regulatórios da diferenciação ou do crescimento celular (56,57).

A tumorigênese tireoidiana parece envolver a ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores tumorais (53,54). Os oncogenes são genes geralmente silenciosos, que podem ser ativados por translocações cromossômicas, deleções ou mutações de proto-oncogenes (58,59). Os oncogenes promovem o crescimento celular em detrimento do processo de diferenciação. Agem de forma dominante, ou seja, mutação em um alelo evoca o fenótipo neoplásico (58). Os proto-oncogenes são genes responsáveis pelo controle do crescimento e do ciclo celular normal, e quando ativados originam os oncogenes. Os proto-oncogenes codificam proteínas envolvidas na cascata de transmissão do sinal para o crescimento celular e podem sofrer ativação e originar um ou mais oncogenes (58,59).

Mutações de ponto no proto-oncogene *ras*, que codifica a proteína Ras (p21), envolvida na transdução do sinal extracelular, têm sido detectadas em tumores benignos e malignos da tireóide (60-63), sugerindo ser um evento inicial no processo de transformação neoplásica da célula tireoidiana. Contudo, estas mutações não são suficientes para a indução de transformação neoplásica (60,62,63). A ativação do *ras* pode estimular a proliferação sem perda da diferenciação celular (64,65). As mutações no proto-oncogene *ras* parecem ser mais comuns nos carcinomas foliculares e anaplásicos, sendo que alguns estudos evidenciaram uma associação destas mutações com a disseminação metastática e/ou com tumores mais agressivos (66,67). Embora as mutações em ponto representem um mecanismo importante de ativação do *ras*, os aumentos na expressão deste proto-oncogene podem estar implicados no

desenvolvimento das neoplasias benignas e na sua progressão para carcinomas tireoidianos (68).

Os rearranjos do proto-oncogene *RET* (*RET/PTC*) têm sido comumente implicados na gênese dos carcinomas papilares, ocorrendo em 2,8 a 61% das formas esporádicas (69-77). O proto-oncogene *RET* codifica um receptor transmembrana tirosina-quinase que não está expresso nas células normais da tireóide. Rearranjos espontâneos do proto-oncogene *RET* têm sido encontrados em 14% dos nódulos benignos (69). Aumentos na prevalência das isoformas *RET/PTC*-1, e sobretudo, *RET/PTC*-3, estão relacionados aos carcinomas papilares de crianças com história de radiação externa e de indivíduos expostos ao acidente de Chernobyl (69-72). Recentemente, têm sido relatada associação do *RET/PTC*-1 com a forma clássica do carcinoma papilar e do *RET/PTC*-3 com as variantes folicular-sólida e de células altas (70,72). A ocorrência dos rearranjos *RET/PTC* em microcarcinomas papilares da tireóide, sugere ser um evento precoce na carcinogênese tireoidiana (73,74). Entretanto, acredita-se que esta alteração, isoladamente, não seja suficiente para evocar a transformação maligna (53). A expressão da proteína Ret não parece estar correlacionada com o prognóstico do carcinoma papilar (74), no entanto, a baixa prevalência de ativação do Ret nos carcinomas pouco diferenciados da tireóide, contraria seu papel na progressão para as formas indiferenciadas (75).

Há evidências de que outros oncogenes tirosina-quinase estejam inapropriadamente ativados nos carcinomas papilares da tireóide. Os rearranjos do proto-oncogene TRK têm sido descritos exclusivamente nesta neoplasia, mas com uma frequência menor do que os rearranjos do *RET/PTC* (59,76). Aumentos na expressão da proteína Met, um receptor tirosina-quinase para o *hepatocyte growth factor* (HGF), têm sido descritos nos carcinomas papilares e atribuídos a um evento secundário, sinalizado por mutações nos oncogenes Ras ou *RET/PTC* (77).

O rearranjo PAX 8-PPAR γ foi recentemente evidenciado como exclusivo dos carcinomas foliculares da tireóide. Este achado corrobora a hipótese de que existam diferenças na patogênese molecular entre estes tumores e os carcinomas papilares da tireóide (78).

O R-TSH e a proteína G $s\alpha$ poderiam, se ativados por mutações somáticas, ser oncogenes candidatos à carcinogênese tireoidiana. As ativações constitutivas desta via (p.ex. mutações na G $s\alpha$) determinam a proliferação progressiva dos tirócitos, usualmente mantendo a diferenciação celular (19). Mutações nestes locais têm sido

descritas nos adenomas hiperfuncionantes, mas ocorrem raramente nos carcinomas diferenciados da tireóide, o que sugere um envolvimento não representativo destas mutações na transformação maligna da célula tireoidiana (79).

Dentre as anormalidades moleculares implicadas na carcinogênese da glândula tireóide, destacam-se as deleções cromossômicas ou mutações que promovem a inativação ou a perda da função dos genes supressores do crescimento tumoral. Destes, o mais conhecido é o gene TP53, que codifica a proteína p53; mutações em ponto neste gene têm sido descritas nos carcinomas anaplásicos (22-83%), mas não nos carcinomas diferenciados da tireóide (80,81), sugerindo que este seja um evento chave na progressão do tumor diferenciado para o anaplásico.

Fatores de crescimento e seus receptores

Aumentos na expressão de fatores de crescimento ou de seus receptores têm sido observados em tumores tireoidianos, podendo ter participação no processo neoplásico (53,54). Tem sido descrito aumento na expressão dos receptores de insulina em carcinomas papilares e foliculares da tireóide (82). Os carcinomas diferenciados do epitélio folicular apresentam maior expressão do *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF) do que os tecidos normais ou os tumores benignos da tireóide (83). No entanto, em tecidos de carcinomas papilares, o fator de crescimento TGF β , que antagoniza os efeitos do TSH, do IGF-I e do EGF em tirócitos de ratos, apresenta-se altamente expresso e com padrão homogêneo pela imunohistoquímica (84). Este resultado sugere que uma resistência à inibição da proliferação das células foliculares pelo TGF β , decorrente da redução na expressão de seus receptores, pode estar implicada na patogênese dos carcinomas da tireóide. O papel destes fatores de crescimento no processo neoplásico ainda não está bem estabelecido. O aumento da expressão dos fatores de crescimento pelas células tumorais tireoidianas parece ser um evento secundário, decorrente da ativação oncogênica de outros mecanismos sinalizadores (53).

Marcadores de diferenciação celular nos carcinomas diferenciados da tireóide

A maioria dos tumores da tireóide derivam das células foliculares e podem se manifestar através de um amplo espectro de fenótipos neoplásicos. Diferentes alterações moleculares têm sido implicadas na patogênese destes tumores (53,54). Os conceitos atuais sobre a carcinogênese da célula folicular da tireóide propõem que

eventos genéticos distintos são responsáveis pela formação dos carcinomas papilar e folicular da tireóide (Figura 3); e que, uma única mutação oncogênica não é suficiente para a indução de transformação maligna (53,59).

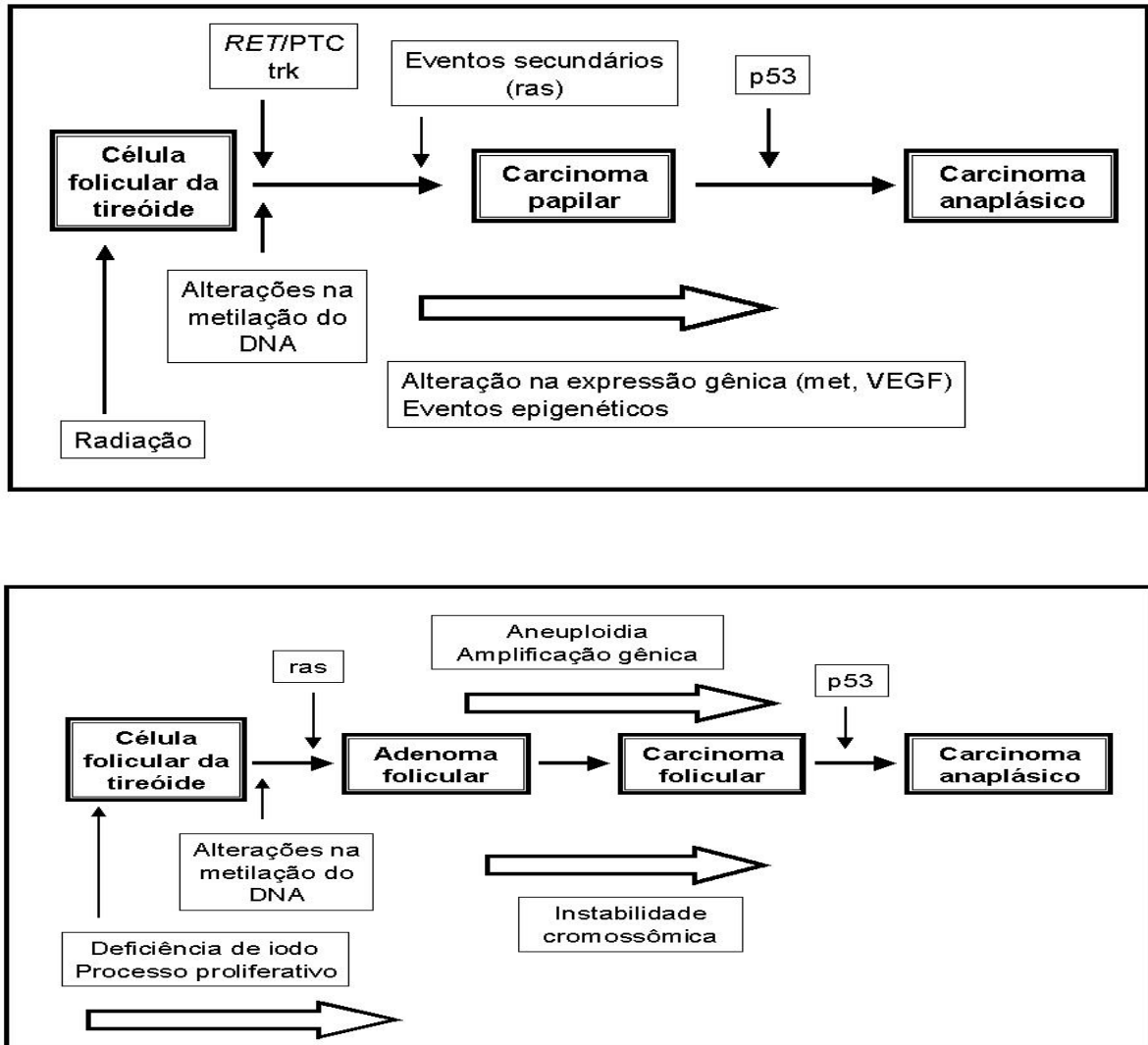


FIGURA 3: Eventos genéticos envolvidos na progressão dos carcinomas papilar (acima) e folicular (abaixo). Adaptado da referência 53.

A associação de carcinoma folicular da tireóide com baixa ingestão de iodo sugere que este tipo de tumor pode se originar de uma glândula com processo proliferativo cronicamente ativado, podendo se formar a partir de adenomas foliculares pré-existentes. De forma contrária, nenhuma lesão benigna precursora foi identificada nos carcinomas papilares, dificultando a determinação dos passos envolvidos na evolução tumoral (53). Aproximadamente 30% dos tumores podem sofrer desdiferenciação secundária a novos eventos moleculares e progredir para carcinoma anaplásico (85). Alguns autores têm sugerido que o carcinoma pouco diferenciado seja uma categoria distinta na classificação dos tumores da tireóide, preenchendo o espaço existente entre os carcinomas bem diferenciados e os anaplásicos ou indiferenciados, tumores altamente agressivos que representam o espectro final da carcinogênese da tireóide (86).

Os carcinomas diferenciados da tireóide (CDT) geralmente conservam as características bioquímicas da célula tireoidiana normal. No entanto, várias anormalidades têm sido demonstradas na expressão gênica das proteínas Tg, TPO, R-TSH e NIS (87-96), responsáveis pela síntese dos hormônios da tireóide, uma atividade altamente diferenciada. A análise da expressão gênica destas proteínas em tecidos normais e neoplásicos da tireóide tem buscado a identificação de possíveis marcadores de diferenciação celular com implicações no diagnóstico, tratamento e prognóstico dos CDT.

Estudos prévios têm demonstrado redução nos níveis de expressão protéica do R-TSH, principalmente em carcinomas papilares da tireóide de pacientes com doença avançada (87,88,89). Alguns estudos demonstraram uma distribuição heterogênea desta proteína entre as células neoplásicas, sugerindo um efeito variável do TSH no crescimento tumoral (89). No entanto, recentemente, pela análise de RT-PCR (reação em cadeia de polimerase através da transcriptase reversa), evidenciou-se que a maioria dos carcinomas papilares e foliculares mantêm a expressão do R-TSH, independente do estágio clínico tumoral (90,91).

Vários estudos, que incluem análise por imunohistoquímica, têm demonstrado redução ou perda da expressão do gene do NIS nos CDT (90-94). A redução ou perda da expressão do NIS pelo tumor pode interferir no uso do ^{131}I para o tratamento e no seguimento dos pacientes com CDT. Contrariando os resultados prévios, recentemente demonstrou-se que a expressão do NIS pode estar normal ou aumentada nos carcinomas da tireóide, porém, a proteína localiza-se predominantemente no

compartimento intracelular, um resultado da inabilidade da célula neoplásica em expressar o NIS na membrana celular (95). Apesar de não ter uma correlação com a expressão do NIS, a redução na expressão da pendrina, uma proteína que transporta o I⁻ intracelular para o colóide, pode contribuir para a diminuição ou perda da habilidade de concentração de iodo detectada em alguns tumores tireoidianos (96). Da mesma forma, têm sido evidenciadas reduções na expressão dos genes da TPO e da Tg apenas em tumores malignos do epitélio tireoidiano, indicando que múltiplos defeitos na síntese hormonal podem ocorrer nos CDT (90,91,92,97).

A possibilidade do acúmulo de defeitos moleculares com a progressão tumoral vem sendo proposta em virtude da diminuição dos níveis de expressão do RNA (RNA mensageiro) para as proteínas tireoidianas nos estágios tumorais mais avançados (90). A correlação da expressão do NIS apenas com a Tg e TPO, revela que outros defeitos nos mecanismos controladores além dos relacionados ao TSH, estão presentes (90,91). No entanto, a discordância observada na prática clínica entre os níveis séricos de Tg e a pesquisa de corpo inteiro com radioiodo pode indicar variações na expressão entre os genes da Tg e do NIS (30,31,98).

Baseado no fato de que somente a célula folicular tireoidiana expressa a Tg, e que sua dosagem sérica demonstra algumas limitações (99), tem sido pesquisada a presença do RNAm da Tg no sangue periférico de pacientes com CDT, para avaliar a presença de doença residual ou metastática. Os resultados demonstram que este é um método sensível para o diagnóstico de doença recorrente, particularmente nos pacientes em uso de tiroxina e com anticorpos anti-tireoglobulina positivos (100,101,102). A avaliação do RNAm do NIS no sangue periférico destes pacientes não parece ser útil, pois pode ser derivado de tecidos extratireoidianos (23,102).

Pouco tem sido abordado sobre o papel da expressão das 5'-desiodases em neoplasias tireoidianas (36,103,104). Estudos prévios com atividade enzimática têm evidenciado que a 5'-desiodação está preservada nas neoplasias diferenciadas da tireóide (36,103,104). A p27, uma proteína identificada inicialmente e que apresentava propriedades funcionais similares a D1, apresentou-se diminuída nos carcinomas papilares da tireóide (105). Em adição, estudos prévios com células da linhagem de carcinomas foliculares da tireóide têm evidenciado um aumento na atividade enzimática da desiodase tipo 1 induzido pelo ácido retinóico, o que indica a possibilidade de rediferenciação celular (106,107).

A clonagem do cDNA (DNA complementar) dos genes humanos da D1 (108), e posteriormente da D2 (109), permitiu o estudo da expressão de ambos genes na tireóide e nos tecidos periféricos. Recentemente, um estudo utilizando a técnica de *microarray*, que permite a avaliação dos níveis de expressão do RNAm de múltiplos genes simultaneamente (110), demonstrou um perfil de expressão altamente consistente com alterações moleculares específicas no carcinoma papilar da tireóide. Dentre os genes relacionados a funções especializadas da tireóide que apresentaram expressão diferencial nos carcinomas papilares, destacou-se o decréscimo na expressão dos genes da D1 e da D2 nestes tumores (111). Outro estudo utilizando atividade enzimática e *Northern-blot*, evidenciou uma redução na atividade e nos níveis de RNAm da D2 no carcinoma papilar da tireóide, um evento atribuído à perda da diferenciação celular (112).

Os mecanismos moleculares que determinam a perda da diferenciação celular são pouco conhecidos. Um maior entendimento da relação entre carcinogênese e diferenciação celular é fundamental, porque a desestruturação do crescimento celular e das propriedades funcionais específicas da tireóide são importantes, não apenas para a determinação do fenótipo e do comportamento tumoral, mas para a definição do prognóstico e das possibilidades terapêuticas futuras.

Referências bibliográficas:

1. Larsen PR, Davis TF, Hay ID: The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. Williams Textbook of Endocrinology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998; 389-515.
2. Schlumberger M, Pacini F. In: Thyroid Tumors. Paris: Éditions Nucléon, 1999; 47-56.
3. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1990; 71: 414-424.
4. DeGroot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:2946-2953.
5. Schlumberger M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. N Engl J Med 1998; 338: 297-306.
6. Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. J Endocrinol Metab 2001; 86: 1447-1463.
7. Almeida JS, Biegler RS, Coutinho LMB. Frequência das neoplasias malignas primárias da tireóide. Rev. AMRIGS, Porto Alegre, 1988; 32: 237-242.
8. Magagnin S, Maia AL. Previous thyroid disease as a prognostic factor in follicular carcinoma of thyroid in a mild deficient iodine area. VIII Congress Latin-American Thyroid Society, May 27-30, 1999, Iguassu Falls, PR, Brazil.
9. Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. Endocrinol Metab Clin North Am 2001; 30: 493-513.
10. Fagin JA. Familial nonmedullary thyroid carcinoma: the case for genetic susceptibility. J Clin Endocrinol Metab 1997; 62: 342-348.

11. Malchoff CD, Malchoff DM. The genetics of hereditary nonmedullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2455-2459.
12. Siperstein AE, Clark O: Surgical therapy. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000; 898-903.
13. Dulgeroff AJ, Hershman JM. Medical therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Endocr Rev* 1994; 15: 500-515.
14. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418-428.
15. Cailleux AF, Baudin E, Trovagli JP, Ricard M, Schlumberger M. Is diagnostic iodine-131 scanning useful after total thyroid ablation for differentiated thyroid cancer? *J Clin Endocr Metab* 2000; 85: 175-178.
16. Capen CC: Comparative anatomy and physiology. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000; 20-43.
17. Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev* 1990; 11: 354-362.
18. Rapoport B: The thyrotropin receptor. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000; 219-227.
19. Epstein FH. The thyrotropin receptor in thyroid diseases. *N Eng J Med* 1997; 337: 1675-1680.
20. Van Sande J, Parma J, Tonacchera M, Swillens S, Dumont J, Vassart G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2577-85.

21. Carrasco N. Thyroid iodide transport: the Na^+/I^- symporter (NIS). In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000; 52-61.
22. Carrasco N. The thyroid sodium-iodide symporter (NIS): cloning and potential clinical applications. *Thyroid Today* 1999; 22: 1-10.
23. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium/iodide symporter gene expression in extrathyroid tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1746-1751.
24. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996; 379: 458-460.
25. Cooper DS. Antithyroid drugs for the treatment of hyperthyroidism caused by Graves' disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27: 225-247.
26. Portmann L, Hamada N, Heinrich G, DeGroot L. Antithyroid peroxidase antibody in patients with autoimmune disease: possible identity with anti-microsomal antibody. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 1001-1003.
27. McLachan SM, Rapoport B. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 1992; 13: 192-197.
28. Nagayama Y, Seto P, Rapoport B. Characterization by molecular cloning, of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 384-390.
29. Dunn JT, Dunn AD: Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis, and proteolysis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner & Ingbar's The thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000; 91-104.

30. Ozata M, Suzuki S, Miyamoto T, Liu RT, Renoy FF, DeGroot LJ. Serum thyroglobulin in the follow-up of patients with treated differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 98-105.
31. Spencer CA, LoPresti JS, Nicoloff JT. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurement. *Thyroid* 1999; 9: 435-441.
32. Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zanini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 97: 13144-13149.
33. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8251-8256.
34. Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. *Endocr Rev* 1984; 5: 151-184.
35. St. Germain DL. Selenodeiodinases: preceptor regulators of thyroid action. *Thyroid Today* 1999; 22: 1-11.
36. Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Imura H. Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 1211-1217.
37. Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cel Mol Life Sci* 2000; 57: 1853-1863.
38. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
39. Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 1996; 98: 962-968.

40. St. Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 1997; 7: 655-668.
41. Maia AL, Harney JW, Larsen PR. Pituitary cells respond to thyroid hormone by discrete, gene-specific pathways. *Endocrinology* 1995; 136: 1488-1494.
42. Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Effect of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) administration on *dio1* gene expression and T₃ metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. *Endocrinology* 1995; 136: 4842-4849.
43. Gereben B, Salvatore D, Harney JW, Tu HM, Larsen PR. The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* 2001; 15:12-24.
44. Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J. Structure of the human type I iodothyronine 5'- deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics* 1997; 42: 361-363.
45. Celi FS, Canetieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Schuldiner AR, Centanni M. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. *Mol & Cel Endocrinol* 1998; 14: 49-52.
46. Baqui MMA, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco A. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 2000; 141: 4309-4312.
47. Roger PP, Taton M, Van Sande J, Dumont JE Mitogenic effects of thyrotropin and cyclic AMP in differentiated human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 66: 1158-1165.
48. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. *Endocr Rev* 2001; 22: 631-656.

49. Medina DL, Santisteban P. Thyrotropin-dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 161-178.
50. Derwahl M, Studer H: Pathogenesis and treatment of multinodular goiter. In: Fagin JA (ed). *Thyroid Cancer*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998; 155-186.
51. Derwahl M, Broecker M, Kraiem Z. Thyrotropin may not be the dominant growth factor in benign and malignant tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 829-834.
52. Goodman AL, Rone JD. Thyroid angiogenesis: endotheliotropic chemoattractant activity from rat thyroid cells in culture. *Endocrinology* 1987; 121: 2131-2140.
53. Fagin JA: Molecular pathogenesis of tumors of thyroid follicular cells. In: Fagin JA (ed). *Thyroid Cancer*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998; 59-83.
54. Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 1994; 15: 202-232.
55. Studer H, Derwahl M. Mechanisms of nonneoplastic endocrine hyperplasia - a changing concept: a review focused on the thyroid gland. *Endocr Rev* 1995; 16: 411-426.
56. Aeschimann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, Studer H. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 846-851.
57. Namba H, Matsuo K, Fagin JA. Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. *J Clin Invest* 1990; 86: 120-125.
58. Fagin JA. Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms. *Thyroid Today* 1994; 27: 1-10.
59. Suárez HG. Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 531-546.

60. Karga H, Lee J-K, Vickery AL, Thor A, Gaz RD, Jameson JL, Suarez HG. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 832-836.
61. Suárez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, Monier R. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 1990; 5: 565-570.
62. Fagin JA. Genetics basis of endocrine disease: molecular defects in thyroid gland neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1398-1400.
63. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, Wynford-Thomas D. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989; 4: 159-164.
64. Gire V, Wynford-Thomas D. Ras oncogene activation induces proliferation in normal human thyroid epithelial cells without loss of differentiation. *Oncogene* 2000; 19: 737-744.
65. Golbert L, Kolling JH, Leitão AH, Maia AL. O proto-oncogene *RAS* induz aumento da expressão da tireoglobulina no bócio nodular humano. *Anais do X Encontro Brasileiro de Tireóide*, Maio, 2002, Ribeirão Preto, SP.
66. Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA. H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 223-229.
67. Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G, Pierotti MA. Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer* 1994; 30A : 987-993.
68. Papadimitriou K, Yiagnisis M, Tolis G, Spandidos DA. Immunohistochemical analysis of the ras oncogene protein in human thyroid neoplasms. *Anticancer Res* 1988; 8: 1223-1228.

69. Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, Pacini F. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3211-3216.
70. Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, Tronko ND, Bogdanova TI, Chiappetta G, Viglietto G, Pentimalli F, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Vecchio G. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4232-4238.
71. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The *ret*/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1170-1175.
72. Cetta F, Gori M, Montalto G, Zuckermann M, Toti P. Different significance of *ret*/PTC(1) and *ret*/PTC(3) rearrangements in thyroid carcinogenesis: lesson from two subgroups of patients with papillary thyroid carcinomas showing the highest incidence of *ret*/PTC activation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1429.
73. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4116-4122.
74. Basolo F, Molinaro E, Agate L, Pinchera A, Pollina L, Chiappetta G, Monaco C, Santoro M, Fusco A, Miccoli P, Elisei R, Capezzone M, Pacini F. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 599-604.
75. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C, Camp RL, Pentimalli F, Monaco C, Herrero A, Carcangiu ML, Fusco A, Tallini G. RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 370-379.

76. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilloti S, Pierotti MA. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor proto-oncogene *ret* and *nrk 1* in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2006-2009.
77. Ivan M, Bond JA, Prat M, Comoglio PM, Wynford-Thomas D. Activated *ras* and *ret* oncogenes induce over-expression of *c-met* (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 2417-2423.
78. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1016-1023.
79. Spambalg D, Sharifi N, Elisi R, Gross JL, Medeiros-Neto G, Fagin JA. Structural studies of the thyrotropin receptor and Gs alpha in human thyroid cancers: low prevalence of mutations predicts infrequent involvement in malignant transformation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3898-3901.
80. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene *p53* mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin invest* 1993; 91:1753-1760.
81. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the *p53* gene in poorly differentiated human thyroid carcinoma. *J Clin Invest* 1993; 91: 179-184.
82. Frittitta L, Sciacca L, Catalfamo R, Ippolito A, Gangemi P, Pezzino V, Filetti S, Vigneri R. Functional insulin receptors are overexpressed in thyroid tumors- Is this an early event in thyroid tumorigenesis ? *Cancer* 1999; 85: 492- 498.
83. Soh EY, Duh Q-Y, Sobhi AS, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia K, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3741-3747.

84. Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, Studer HI. Expression of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. *Thyroid* 1999; 9: 119-125.
85. Goretzki PE, Simon D, Frilling A, Witte J, Reiners C, Grussendorf M, Horster FA, Röher HD. Surgical reintervention for differentiated thyroid carcinoma. *Brit J Surg* 1994; 80:1131-1134.
86. Biddinger P, Nikiforov Y: Pathological features of thyroid tumors. In: Fagin JA (ed). *Thyroid Cancer*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998; 105-137.
87. Ohta K, Endo T, Onaya T. The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 174: 1148-1153.
88. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Masuda E, Kitaichi M, Komaki K, Monden Y. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Brit J Cancer* 1997; 76: 594-599.
89. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Komaki K, Monden Y. Heterogeneous distribution of thyrotrophin receptor messenger ribonucleic acid (TSH-R mRNA) in papillary thyroid carcinomas detected by *in situ* hybridization. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 259-267.
90. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3228-3234.
91. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, Arime I, Yamamoto S, Kurebayashi J, Shimosuma. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 340-346.
92. Brabant G, Maenhaut C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE. Human thyrotropin receptor gene: expression

- in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 82: R7-R12.
93. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suárez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2493-2496.
94. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4102-4106.
95. Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2697-2700.
96. Arturi F, Russo D, Bidart JM, Scarpelli D, Schlumberger M, Filetti S. Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 129-135.
97. Christensen L, Toft MB, Brandt M, Lange M, Sneppen SB, Ravnsbaek J, Mollerupt I, Strange L, Jensens F, Kirkegaard J, Hansen HS, Sorensen SS, Feldt-Rasmussen U. Thyroperoxidase (TPO) immunostainong of the solitary cold thyroid nodule. *Clin Endocrinol* 2000 ; 53: 161-69.
98. Pineda JD, Lee T, Ain K, Reynolds JC, Robbins J. Iodine-131 therapy for thyroid cancer patients with elevated thyroglobulin and negative diagnostic scan. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1488-1492.
99. Schlumberger M, Baudin E. Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998;138: 249-252.

100. Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4435-4442.
101. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle M. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4037-4442.
102. Biscolla RPM, Cerutti JM, Maciel RMB. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3623-3627.
103. Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Matsuzuka F, Kuma K, Imura H. Sequential deiodination of thyroxine in human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 890-896.
104. Sugawara M, Lau R, Wasser H, Nelson AM, Kuma K, Hershman J. Thyroid T4 5'-deiodinase activity in normal and abnormal human thyroid glands. *Metabolism* 1984; 33: 332-336.
105. Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Yoshimura M, Masaki H, Gondou A, Yonemoto T, Inada M. Identification of a 27-kilodalton protein with the properties of type I iodothyronine 5'-deiodinase in human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 533-538.
106. Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 791-98.
107. Schmutzler C, Köhrle J. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid* 2000; 5: 393-406.

108. Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1133-1139.
109. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St Germain DL, Galton VA. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 26786-26789.
110. Celis JE, Kruhoffer M, Gromova I, Frederiksen C, Ostergaard M, Thykjaer T, Gromov P, Yu J, Pásdóttir H, Magnusson N, Orntoft T. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Letters* 2000; 480: 2-16.
111. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 15044-1549.
112. Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 2001; 142: 2961-2967.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO:

Vários estudos têm objetivado a análise do perfil de expressão dos genes tireo-específicos nos tumores da tireóide, com a finalidade de identificar marcadores de diferenciação celular importantes para a compreensão da patogênese e do comportamento biológico destes tumores. Neste sentido, o estudo das principais proteínas (R-TSH, NIS, TPO, Tg) envolvidas no processo de biossíntese dos hormônios tireoidianos tem acrescentado valiosas informações para o entendimento do processo neoplásico. Poucos estudos abordaram a expressão das 5'-desiodases, enzimas importantes envolvidas na síntese e no metabolismo dos hormônios tireoidianos, nas neoplasias da tireóide.

O objetivo do presente estudo é avaliar o perfil de expressão dos genes das desiodases tipo 1 e tipo 2 nas neoplasias da tireóide.

Redução da Expressão das Iodotironinas Desiodases Tipo 1 e Tipo 2 no Carcinoma Papilar da Tireóide

Erika L. de Souza Meyer, José Miguel Dora, Lenara Golbert,
Márcia Wagner e Ana Luiza Maia

Título abreviado: Expressão das 5'-desiodases no carcinoma papilar da tireóide

Palavras-chave: desiodases, carcinoma papilar da tireóide, carcinoma folicular da tireóide, neoplasia, expressão gênica

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Brasil.

Correspondências: Dra. Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: (51)3316-8127; Fax: (51)3332-5188; e-mail: almaia@vortex.ufrgs.br

Resumo

Os carcinomas diferenciados da tireóide são derivados das células foliculares; no entanto, os eventos genéticos envolvidos na formação do carcinoma papilar da tireóide parecem ser diferentes do carcinoma folicular. As desidases tipo I (D1) e tipo II (D2) catalisam um essencial passo na ativação dos hormônios tireoidianos, através da 5'-monodesiodação do T₄. Ambas isoenzimas são altamente expressas na glândula tireóide normal. No presente estudo, investigamos a expressão dos genes da D1 e da D2 através da técnica de RT-PCR, em uma selecionada série de neoplasias benignas e malignas da tireóide. Os resultados demonstraram que no carcinoma papilar da tireóide, os níveis de RNAm da D1 e da D2 estão marcadamente reduzidos no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal adjacente (P= 0.016 e P= 0.003, respectivamente). A redução da expressão da D1 e da D2 foi observada nos diferentes subtipos histológicos e estágios clínicos analisados, incluindo microcarcinomas. Em contraste, não houve diferenças significativas nos níveis de RNAm da D1 e da D2 nas lesões foliculares, adenomas (P= 0.196 e P= 0.984, respectivamente) e carcinomas (P= 0.325 e P= 0.963, respectivamente). Além disso, foi observado que os genes da D1 e da D2 estão expressos no carcinoma medular, um tumor derivado das células C da tireóide. Nossos resultados sugerem que a redução na expressão da D1 e da D2 pode ser um evento precoce e específico na desdiferenciação da célula folicular tireoidiana em carcinoma papilar da tireóide.

Introdução

As iodotironinas desiodases tipo I (D1) e tipo II (D2) catalisam a 5'-monodesiodação do T₄, um passo essencial na ativação do hormônio tireoidiano. A D1 fornece uma fração significativa do T₃ plasmático em humanos e está expressa principalmente no fígado, rins, tireóide e hipófise anterior de indivíduos eutireoideos. A expressão da D2 parece ser mais ampla, com grande quantidade de transcritos encontrados na glândula tireóide, no cérebro, na medula espinhal, na placenta e nos músculos cardíaco e esquelético. No entanto, permanece desconhecido com que extensão estes transcritos são traduzidos em proteína funcional. As 5'-desiodases apresentam diferentes características bioquímicas e regulatórias, exibem diferentes padrões de distribuição tecidual, e respostas distintas ao *status* tireoidiano e aos inibidores específicos (1).

Os carcinomas diferenciados da tireóide, papilar e folicular, são derivados das células foliculares da tireóide, porém, os eventos moleculares envolvidos na formação do carcinoma papilar da tireóide (CPT) parecem ser diferentes do carcinoma folicular da tireóide (CFT) (2). As neoplasias diferenciadas da tireóide geralmente mantêm as características bioquímicas da célula epitelial normal, contudo, diversas anormalidades têm sido demonstradas na expressão das principais proteínas envolvidas na complexa maquinaria da síntese dos hormônios tireoidianos. Diferentes estudos têm demonstrado um decréscimo na expressão de genes específicos da tireóide, como o *simporter* Na⁺/I⁻ (NIS), a tireoglobulina (Tg), o receptor do TSH (R-TSH) e a tireoperoxidase (TPO) em tumores pouco diferenciados, com abolição da expressão em tumores indiferenciados (3-8). Em humanos, ambas isoenzimas (D1 e D2) são altamente expressas em tireóides normais ou estimuladas. A D1 parece ser expressa constitutivamente, enquanto que a expressão da D2 varia conforme o grau de estimulação tireoidiana (9). Estudo prévio avaliando a atividade enzimática, têm sugerido que a 5'-desiodação está conservada nas neoplasias diferenciadas da tireóide (10). No entanto, recentemente, foi demonstrada redução da atividade e dos níveis de RNAm da D2 no carcinoma papilar da tireóide, alterações estas relacionadas à transformação maligna da célula folicular tireoidiana (11).

No presente estudo, determinamos o perfil de expressão da D1 e da D2 em carcinomas papilares e foliculares da tireóide. Demonstramos uma marcada diminuição da expressão de ambos os transcritos no CPT. Nas lesões foliculares, adenomas frios e

carcinomas, não houve diferenças significativas nos níveis de RNAm da D1 e da D2. Além disto, evidenciamos que os genes da D1 e da D2 estão expressos no carcinoma medular da tireóide (CMT), um tumor originado das células C parafoliculares.

Materiais e Métodos

Pacientes

Foram analisadas 30 amostras (bócio multinodular, n=10; adenoma folicular, n=4; carcinoma folicular, n=3; carcinoma papilar, n=7; carcinoma medular, n=6) consecutivas e não-selecionadas, de tumores tireoidianos coletadas de pacientes atendidos nos Serviços de Endocrinologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O procedimento cirúrgico foi independentemente indicado pelo médico assistente, conforme as indicações clínicas. Os tecidos foram obtidos durante a cirurgia, sendo imediatamente congelados e armazenados até o momento das análises. Os tumores tireoidianos foram classificados histologicamente conforme as recomendações da World Health Organization (WHO) (12). Os dados clínicos foram obtidos retrospectivamente através do prontuário médico. O TSH sérico foi dosado pelo ensaio com duplo anticorpo (Immulite, Diagnostic Products). As informações obtidas através deste estudo não influenciaram ou afetaram o diagnóstico e/ou tratamento dos pacientes estudados. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA aprovou o protocolo de estudo e todos os pacientes forneceram o consentimento informado.

Preparo do tecido e Extração do RNA

As amostras foram obtidas dos tecidos tumoral e normal adjacente no momento da cirurgia. Nos bócios multinodulares, as amostras foram coletadas do nódulo dominante. Cada tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -70°C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído de 50 - 100 mg de tecido tireoidiano tumoral e normal circunjacente, utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY,USA) conforme as instruções do fabricante. A pureza e a integridade do RNA total foi determinada pelo espectrofotômetro ultra-violeta

(GeneQuant II[®], Amersham Pharmacia Biotech) e eletroforese em gel desnaturante de agarose (presença das bandas 28S e 18S).

Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

Foi utilizada a técnica semi-quantitativa de RT-PCR para determinar os níveis de expressão dos genes da D1 e D2 nas amostras de RNA extraídos dos tecidos tireoidianos. A transcrição reversa(RT) foi realizada utilizando o *Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*(Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY, USA) a partir de 3 µg do RNA total. Oligonucleotídeos específicos derivados da região codificadora da seqüência publicada dos genes humanos da D1 (5'-AAGAGGCTCTGGGTGCTCTTGG-3' e 5'-GGTTCTGGTGATTTCTGATGTC-3') e da D2 (5'-ACTCGGTCATTCTGCTCAAG-3' e 5'-GAGAACTCTCCACCAGTTTG-3') foram utilizados para amplificar o DNA complementar (cDNA) alvo, resultando em produtos de 498 e 368 pb, respectivamente (13,14). Para controle interno foram utilizados *primers* da β_2 -microglobulina(5'-ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG-3' e 5'AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC-3'), gerando um produto de 623 pb. As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas separadamente para a D1 e D2 que co-amplificaram a β_2 -microglobulina na mesma reação, com a finalidade de avaliar a variação inter-amostra na quantidade de cDNA e a eficiência da PCR. As reações de PCR incluíram 0,5 e 1 µl de cDNA para a amplificação da D1 e D2, respectivamente, e foram realizadas com Taq DNA polymerase (Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY, USA), em um volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram: um passo inicial de desnaturação à 94°C por 3 min, seguido de 94°C por 1 min, anelamento à 58°C (D1) ou 60°C (D2) e extensão à 72°C por 2 min. Foram utilizados 25 ciclos para a amplificação da D1 e 30 ciclos para a D2, com uma extensão final de 72°C por 4 min. Os *primers* da β_2 -microglobulina foram incluídos após o 5º ciclo para D1 e 10º ciclo para D2. Como controles negativos foram realizadas reações de PCR sem a inclusão de cDNA. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Após a amplificação, 10 µl de produto da PCR foi analisado em gel de agarose à 1,5% corado com brometo de etídio e a intensidade de cada banda foi determinada por densitometria óptica (unidades arbitrárias) (ImageMaster[®] VDS, Amersham Pharmacia Biotech). Finalmente, a

intensidade das bandas da D1 e da D2 foram comparadas com a intensidade da banda correspondente da β_2 -microglobulina.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como média e desvio-padrão(DP), exceto se especificado de outra forma. Para comparar os níveis de RNAm dos genes da D1 e da D2 entre o tecido tumoral e o tecido normal correspondente, foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas. Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Pacientes

A tabela 1 demonstra as características clínicas e histopatológicas dos pacientes estudados. O estágio clínico foi determinado pelo sistema TNM (15).

Expressão do RNAm da D1 e da D2 nos tumores derivados da célula folicular da tireóide

A comparação entre as médias e as medianas dos níveis de RNAm da D1 e da D2, em unidades arbitrárias, obtidas dos tecidos normais correspondentes, não demonstrou diferenças significativas, indicando a ausência de uma ampla variabilidade na expressão dos genes da D1 e da D2 nos tecidos normais da tireóide (P= 0.262 e P= 0.766, respectivamente).

A figura 1 demonstra os níveis de RNAm da D1 e da D2 nas amostras de CPT. A expressão dos genes da D1 e da D2 apresentou-se significativamente reduzida no tecido tumoral, quando comparado ao tecido normal adjacente (P= 0.016 e P= 0.003, respectivamente) (Fig. 1A e B). Estes resultados ocorreram em todas as amostras analisadas, constituída por diferentes subtipos histológicos e estágios clínicos, incluindo microcarcinomas.

Em contraste, não evidenciamos diferenças significativas nos níveis de RNAm da D1 e da D2 nas lesões foliculares, adenomas ($P= 0.196$ e $P= 0.984$, respectivamente) e carcinomas ($P= 0.325$ e $P= 0.963$, respectivamente), quando comparados com os tecidos normais adjacentes (Fig 2A e B).

Desde que o bócio multinodular é considerado uma verdadeira neoplasia tireoidiana, analisamos a expressão da D1 e da D2 no nódulo dominante, que apresentava-se frio à cintilografia de tireóide com iodo. Não houve diferenças significativas na expressão dos genes da D1 e da D2 entre os nódulos e os tecidos adjacentes correspondentes (2.73 ± 2.95 vs. 1.37 ± 0.88 , $P= 0.128$ e 1.37 ± 1.30 vs. 0.95 ± 0.73 , $P= 0.262$, respectivamente).

Determinação dos níveis de RNAm da D1 e da D2 nos carcinomas medulares da tireóide

A investigação foi ampliada para a análise dos tumores de pacientes com carcinoma medular de tireóide (CMT), com a finalidade de determinar a expressão dos genes da D1 e da D2 em outras neoplasias malignas da glândula tireóide. Ambos genes da D1 e da D2 estavam expressos em todas as amostras de CMT. Os níveis de expressão do gene da D1 nos tumores de células C, determinados por RT-PCR, se sobrepuseram aos valores de mRNA detectados nos tecidos tireoidianos normais ($P= 0.814$, Fig 3). A média dos níveis de RNAm da D2 foi menor nas amostras tumorais, porém sem diferença estatisticamente significativa ($P= 0.137$, Fig 3).

Discussão

No presente estudo, analisamos a expressão da D1 e da D2 em amostras de tecido tireoidiano normal e tumoral através da técnica semi-quantitativa de RT-PCR. Nossos resultados demonstram que os níveis de RNAm da D1 e da D2 estão marcadamente reduzidos nos CPT quando comparados com o tecido não-tumoral correspondente. Embora o CPT seja clinicamente heterogêneo, o padrão de expressão da D1 e da D2 mostrou marcada consistência, sendo observada uma importante redução na expressão de ambas desidases, inclusive nos microcarcinomas. De forma contrária, não observamos alterações significativas na expressão da D1 e da D2 nas lesões

foliculares, adenomas e carcinomas, no bócio multinodular e no carcinoma medular da tireóide.

Dentre as formas de câncer diferenciado das células foliculares da tireóide, o CPT é a mais comum, sendo o CFT raro nos dias atuais (16). Os eventos genéticos que determinam a formação do CPT parecem ser diferentes do CFT (2). A etiologia e a biologia molecular do CPT são pouco conhecidas, levando em consideração que não há uma lesão histológica reconhecidamente precursora desta neoplasia. Os rearranjos *RET/PTC* podem ocorrer como um evento inicial na gênese do carcinoma papilar, no entanto, estes rearranjos isoladamente não são suficientes para evocar a transformação maligna (17). Os conceitos atuais sobre as alterações moleculares seqüenciais envolvidas na tumorigênese da tireóide, sugerem que o CFT provavelmente se desenvolva a partir de adenomas foliculares (2,18). Embora a comprovação desta transição adenoma-carcinoma não esteja estabelecida, a existência de fenótipos intermediários (p.ex. carcinoma folicular minimamente invasivo) corrobora esta hipótese.

Vários estudos têm focado a análise seriada do perfil de expressão gênica em carcinomas diferenciados da tireóide, com a finalidade de identificar novos genes e possíveis marcadores de diferenciação celular. Tem sido demonstrada uma redução na expressão do gene do NIS em tumores tireoidianos benignos e malignos hipofuncionantes (3,5,6). Outros estudos têm evidenciado um decréscimo na expressão de genes específicos da tireóide, como o R-TSH, a Tg e a TPO, em tumores pouco diferenciados, e abolição nos tumores indiferenciados (4,7,8). Há poucos dados na literatura a respeito da expressão das desidases nas neoplasias da tireóide (10,11,19). Recentemente, através da análise pela técnica de *microarray*, demonstrou-se um padrão diferencial de expressão gênica nos CPT. Neste estudo, os autores evidenciaram um perfil de expressão gênica altamente consistente, com redução da expressão de vários genes importantes na função da célula folicular tireoidiana, entre estes, os genes da D1 e da D2 (20). Em concordância, no presente estudo, através da análise por RT-PCR, foi observada uma marcada redução nos níveis de expressão de ambos genes em uma série de amostras de CPT, que incluiu diferentes subtipos histológicos e estágios tumorais. De modo interessante, a redução na expressão da D1 e da D2 foi detectada em microcarcinomas. Este padrão de expressão contrasta com o que tem sido descrito para outros genes, como o R-TSH, que apresenta significativa diminuição da expressão nos casos avançados da doença (21, 22). Nossos achados

sugerem que a diminuição da expressão da D1 e da D2 pode ocorrer precocemente no processo da desdiferenciação celular e formação do CPT.

A razão para a redução dos níveis de RNAm da D1 e da D2 nos CPT é desconhecida. Alterações nos níveis de expressão de diferentes genes são comuns em muitos cânceres e podem resultar de mutações nos fatores de transcrição, perda da diferenciação celular durante a transformação neoplásica ou desregulação na expressão dos genes devido a alterações nos mecanismos de controle (23,24,25). Tem sido observado um decréscimo da atividade e dos níveis de RNAm da D1 em carcinomas renais de células claras (26), no entanto, os níveis de RNAm da D2 podem permanecer normais ou elevados em tumores cerebrais e células da linhagem de mesoteliomas (27,28), apesar da desdiferenciação celular. Um intrigante aspecto de nossos achados, é a marcada similaridade no padrão de expressão dos genes da D1 e da D2 nos CPT, uma vez que estes genes apresentam diferentes características regulatórias (1). A identificação dos mecanismos responsáveis por estes achados, pode determinar uma importante compreensão dos caminhos regulatórios das células neoplásicas tireoidianas.

Em contraste, não detectamos diferenças nos níveis de expressão dos genes da D1 e da D2 nas lesões foliculares, adenomas e carcinomas, indicando um padrão distinto de expressão destas isoenzimas entre carcinomas papilares e foliculares. Estes resultados são interessantes, porque estão de acordo com os recentes conceitos sobre os eventos moleculares envolvidos na desdiferenciação da célula epitelial tireoidiana, em que se propõem a presença de rotas específicas para a formação das neoplasias papilares e foliculares (2,18). Deste modo, a perda da expressão das desidases pode ser um marcador precoce da transformação celular em carcinoma papilar da tireóide.

No bócio multinodular, uma neoplasia benigna derivada da célula folicular da tireóide, foi observada uma ampla variação na expressão da D1 e da D2 nos nódulos e tecidos adjacentes. Estes resultados foram esperados, pois a heterogeneidade de função é uma característica marcante dos bócios multinodulares humanos (29).

Uma possível limitação deste estudo é a análise de uma pequena amostra de carcinomas foliculares. A inclusão de adenomas na análise reforça nossos resultados, pois estes são considerados lesões precursoras do CFT. No entanto, acreditamos que um maior número de carcinomas foliculares deva ser analisado.

A detecção da expressão dos genes da D1 e da D2 nos CMT foi inesperada, uma vez que o CMT se origina das células C parafoliculares da tireóide, que não estão

envolvidas na síntese e no metabolismo dos hormônios tireoidianos. No entanto, pelo fato de não termos analisado células C parafoliculares normais, não podemos excluir definitivamente alterações nos níveis de expressão da D1 e da D2. Nestas neoplasias, não observamos diferenças significativas nos níveis de RNAm da D1 e da D2 quando comparados aos tecidos normais adjacentes.

Em conclusão, demonstramos uma consistente e significativa redução da expressão dos transcritos dos genes da D1 e da D2 no carcinoma papilar de tireóide. Nas lesões foliculares, adenomas hipofuncionantes e carcinomas, não observamos diferenças significativas nos níveis de RNAm de ambas isoenzimas. Além disto, foi demonstrado que as 5'-desiodases estão expressas no carcinoma medular da tireóide, um tumor das células C parafoliculares. Nossos achados sugerem que os baixos níveis de expressão da D1 e da D2 podem ser um evento precoce e específico na desdiferenciação da célula folicular em carcinoma papilar da tireóide.

Referências bibliográficas:

1. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
2. Fagin JA. Molecular pathogenesis of tumors of thyroid follicular cells. In: Fagin JA (ed). *Thyroid cancer*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998; 59-83.
3. Ryu KY, Senokozlieff ME, Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporter. *Thyroid* 1999; 9: 405-409.
4. Otha K, Endo T, Onaya T. The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 1148-1153.
5. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2493-2496.
6. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na⁺ / I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3228-3234.
7. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, Arime I, Yamamoto S, Kurebayashi J, Shimozuma K. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 340-346.

8. Brabant G, Maenhaut C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, Mühlen A, Vassart G, Dumont JE. Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 82: R7-R12.
9. Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 1996; 98:962-968.
10. Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Imura H. Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52:1211-1217.
11. Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 2001; 142: 2961-2967.
12. Hedinger CE, Williams ED, Sobin LH. Histological typing of thyroid tumors. In: WHO, International histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1988; 5-6.
13. Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1133-1139.
14. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St.Germain DL, Galton VA. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 26786-26789.
15. American Joint Committee on Cancer: Head and neck tumors. Thyroid gland. In: Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH, Eds. Manual for staging of cancer. Philadelphia: J.B. Lippincott; 53-54.
16. Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1447-1463.

17. Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T, Iwamoto KS, Seyama T. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1997; 15: 1455-1460.
18. Suárez HG. Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 531-546.
19. Sugawara M, Lau R, Wasser HL, Nelson AM, Kuma K, Hershman M. Thyroid T4 5'-deiodinase activity in normal and abnormal human thyroid glands. *Metabolism* 1984; 33: 332-336.
20. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 15004-15049.
21. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Komaki K, Monden Y. Heterogeneous distribution of thyrotropin receptor messenger ribonucleic acid (TSH-R mRNA) in papillary thyroid carcinomas detected by *in situ* hybridization. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 259-267.
22. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Masuda E, Kitaichi M, Komaki K, Uyama T, Monden Y. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Br J Cancer* 1997; 76: 594-599.
23. Latchman DS. Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 28-33.
24. Eggo MC, Hopkins JM, Franklyn JA, Johnson GD, Sanders DS, Sheppard MC. Expression of fibroblast growth factors in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1006-1011.
25. Ivan M, Bond JA, Prat M, Comoglio PM, Wynford-Thomas D. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 2417-2423.

26. Pachucki J, Ambroziak M, Tanski Z, Luczak J, Nauman J, Nauman A. Type I 5'-iodothyronine deiodinase activity and mRNA are remarkably reduced in renal clear cell carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 253-261.
27. Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M. Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4403-4406.
28. Curcio C, Baqui MMA, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *J Biol Chem* 2001; 276: 30183-30187.
29. Aeschimann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, Studer H. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 846-851.

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com tumores de tireóide.

Paciente no.	Sexo /idade (anos)	TSH ^a	Histologia	Tamanho (cm)	Estágio ^b	Órgãos invadidos
Carcinomas papilares						
1	M/56	0.44	Tipo clássico	4.0	3	Tecido conjuntivo e músculo esquelético cervical
2	M/35	1.76	Tipo clássico; multifocal	0.5	1	Linfonodos cervicais e tecido fibroadiposo
3	F/30		Tipo clássico	1.0	1	
4	F/29	0.93	Tipo clássico	3.2	1	Linfonodos cervicais
5	F/52	0.02	Tipo clássico	1.2	2	
6	F/22		Tipo clássico	1.0	1	Linfonodos cervicais
7	F/10	3.14	Variante esclerosante difusa		2	Linfonodos cervicais metástases pulmonares
Adenomas foliculares não-tóxicos						
8	M/37			2.7		
9	F/41	1.00		2.0		
10	M/47	2.95		3.8		
11	F/69	1.56		3.0		
Carcinomas foliculares						
12	F/28	1.12		5.0	1	
13	F/23	0.83		2.5	1	
14	F/66	5.81		2.5	2	
Bócios multinodulares						
15	F/67	0.57		3.3		
16	F/35	0.84		2.9		
17	F/51	2.10		7.0		
18	F/40	0.88		4.0		
19	F/48	2.40		1.4		
20	F/46	0.49		2.4		
21	F/54	0.32		3.1		
22	F/60	2.40		3.3		
23	F/51	0.07		3.1		
24	F/56	0.18		3.0		
Carcinomas medulares						
25	F/22	0.64	Multifocal; hiperplasia células C	1.3	2	
26	F/54	0.87		2.2	2	
27	F/50	2.55		5.0	2	
28	F/33	2.19	Multifocal	1.3	2	
29	M/15	1.72	Multifocal; hiperplasia células C	1.2	2	
30	F/37	0.95	Multifocal; hiperplasia células C	3.0	3	Linfonodos cervicais

^a TSH: valores de referência 0.4 - 4.0 mUI/L^b Estágio de acordo com o sistema TNM (15)

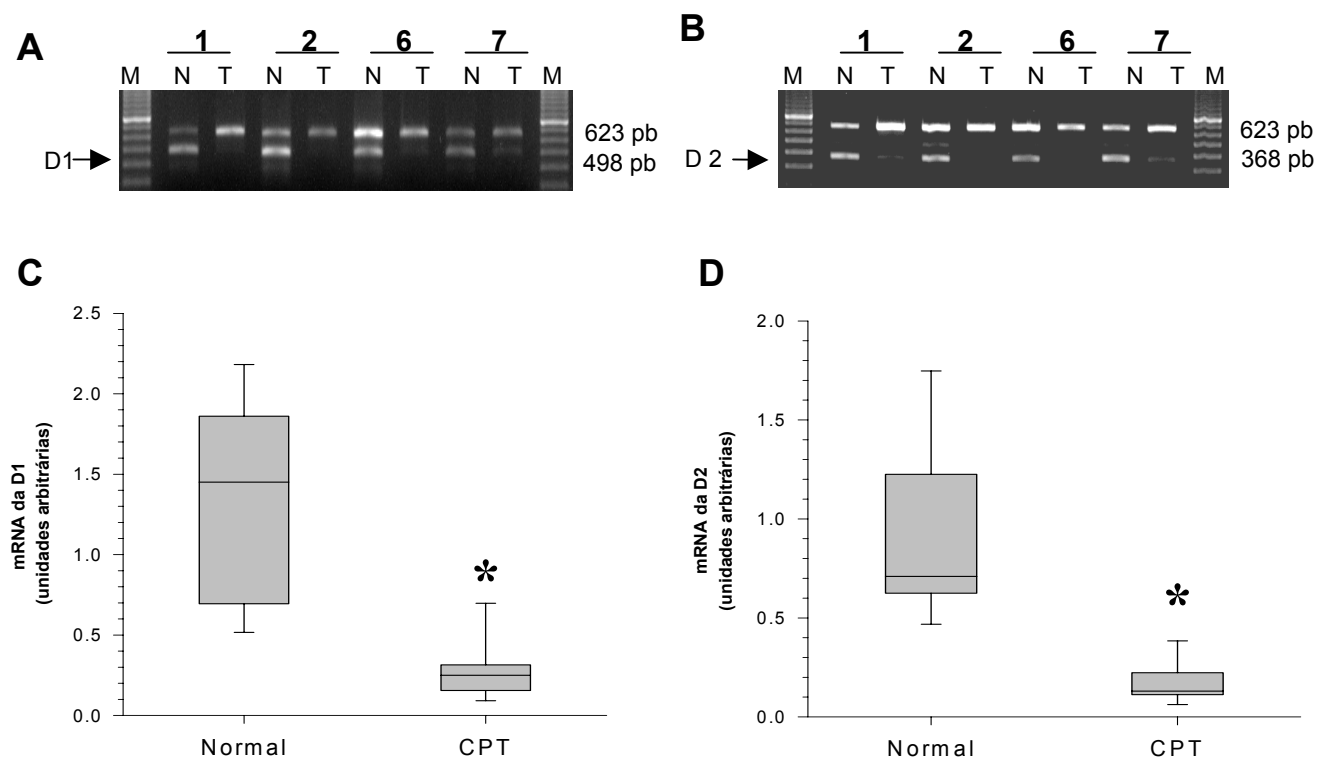


FIGURA 1

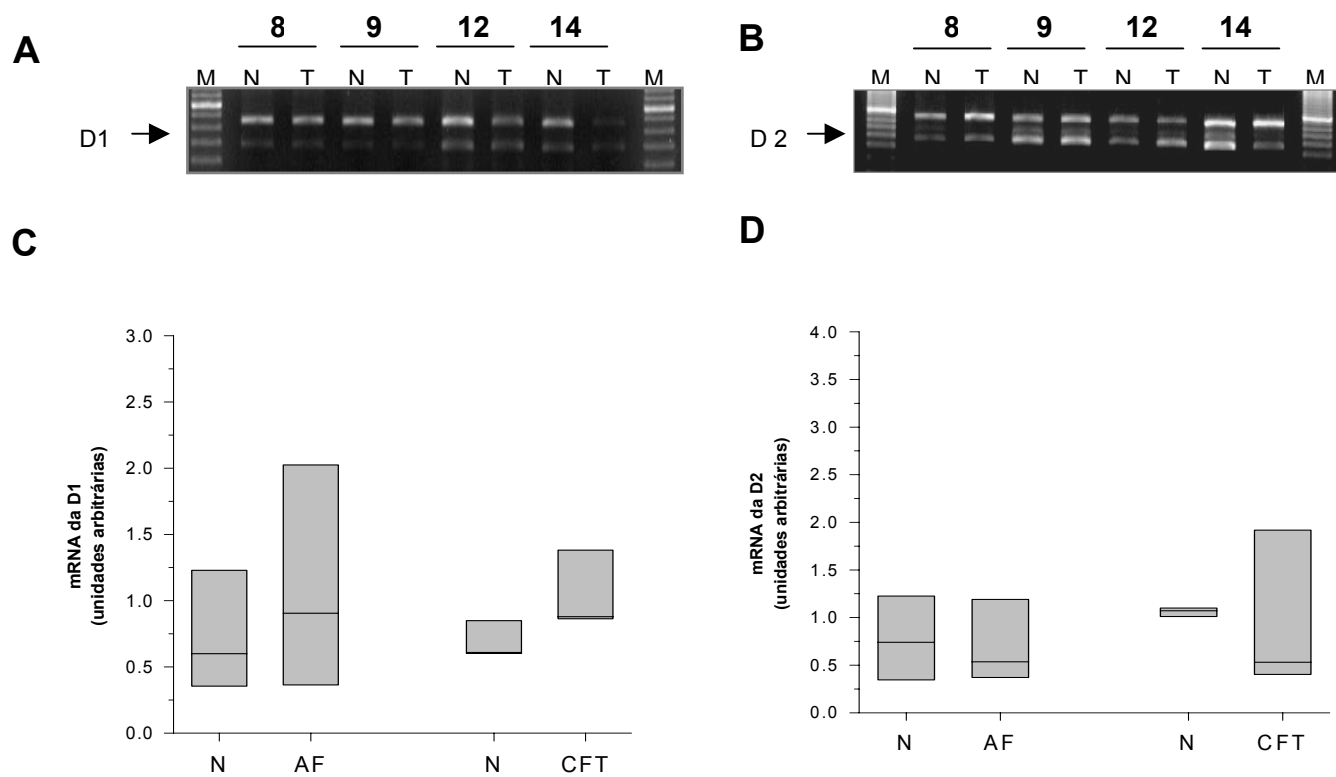


FIGURA 2

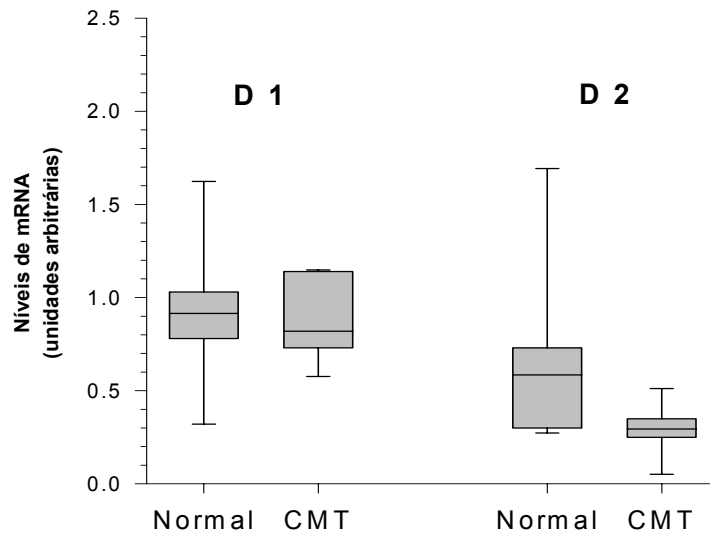
**FIGURA 3**

Fig. 1. Expressão dos genes da D1 e da D2 no carcinoma papilar da tireóide (CPT). **A, B.** Um RT-PCR ilustrativo dos produtos da D1 (A) e da D2 (B) no tumor (T) e tecido normal correspondente (N) nos casos 1, 2, 6 e 7 (tabela 1) em gel de agarose à 1.5% corado com brometo de etídio. **C, D.** Box plots dos níveis de RNAm da D1 (C) e D2 (D) no tecido normal e no CPT. A caixa representa o intervalo interquartil que contém 50% dos valores. As linhas divergentes demonstram os valores extremos. A linha que atravessa a caixa indica a mediana. Os resultados estão expressos em relação a densidade óptica da β_2 -microglobulina correspondente (unidades arbitrárias, veja material e métodos). * $P < 0,02$ vs. tecido normal.

Fig. 2. Expressão dos genes da D1 e da D2 no adenoma folicular (AF) e carcinoma folicular da tireóide (CFT). **A, B.** Um RT-PCR ilustrativo dos produtos da D1 (A) e da D2 (B) no tumor (T) e no tecido adjacente correspondente (N) nos casos 8, 9, 12 e 14 (tabela 1) em gel de agarose à 1.5% corado com brometo de etídio. **C, D.** Box plots dos níveis de mRNA da D1 (C) e D2 (D) no tecido normal, AF e CFT. A caixa representa o intervalo interquartil que contém 50% dos valores. A linha que atravessa a caixa indica a mediana. Os resultados estão expressos em relação à densidade óptica da β_2 -microglobulina (unidades arbitrárias, veja material e métodos)

Fig. 3. Box plots dos níveis de RNAm da D1 e da D2 no tecido normal (N) e no carcinoma medular da tireóide (CMT). A caixa representa o intervalo interquartil que contém 50% dos valores. As linhas divergentes demonstram os valores extremos. A linha que atravessa a caixa indica a mediana. Os resultados estão expressos em relação à densidade óptica da β_2 -microglobulina (unidades arbitrárias, veja material e métodos).

Decreased Type 1 and Type 2 Iodothyronine Deiodinases Expression in Papillary Thyroid Carcinoma

Erika L de Souza Meyer, M.D., José Miguel Dora, Lenara Golbert , M.D.,
Márcia Wagner , Ph.D. and Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Short title: 5´deiodinases expression in papillary thyroid carcinoma

Key words: deiodinase, papillary thyroid carcinoma, follicular thyroid carcinoma, neoplasia, gene expression

Grant support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Brazil.

Correspondence and Reprints: Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035 –003 Porto Alegre, RS, Brazil Phone: 55-51-3316-8127; Fax: 55-51-3332-5188;

E-mail: almaia@vortex.ufrgs.br

Abstract

Differentiated thyroid carcinomas are derived from thyroid follicular cell even though the genetics events towards papillary thyroid carcinoma formation appear to be different from those in follicular carcinomas. Type I (D1) and type II (D2) deiodinase catalyze an essential step in thyroid hormone activation by 5' monodeiodination of T₄ and both are highly expressed in normal thyroid gland. In the present study we investigated D1 and D2 gene expression by RT-PCR in a selected series of benign and malignant thyroid neoplasias. We demonstrated that in papillary thyroid carcinoma, D1 and D2 mRNA were markedly decreased in tumor compared to surrounding tissue (P= 0.016 and P= 0.003, respectively). Decreased D1 and D2 expression was remarkably consistent and it was observed in the different histological subtypes and clinical stages analyzed, including microcarcinomas. By contrast, no significant differences in D1 and D2 mRNA levels were found in follicular lesions, neither adenoma (P= 0.196 and P= 0.984, respectively) nor carcinoma (P= 0.325 and P =0.963, respectively). Moreover, we found that D1 and D2 genes are expressed in medullary thyroid carcinoma, a thyroid C cell derived tumor. Our results suggest that decreased D1 and D2 expression might be an early and discrete event in thyroid follicular cell dedifferentiation towards papillary thyroid carcinoma.

Introduction

Type I (D1) and type II (D2) iodothyronine deiodinase catalyze 5'-monodeiodination of T₄, an essential step in thyroid hormone activation. D1 supplies a significant fraction of plasmatic T₃ in humans and it is mainly expressed in liver, kidney, thyroid, and euthyroid anterior pituitary. D2 expression appears to be more widespread with large amounts of D2 transcripts found in thyroid gland, brain, spinal cord, placenta and cardiac and skeletal muscles, although the extent of translation of these D2 mRNA into functional D2 protein is still unknown. These two isoenzymes present rather different biochemical and regulatory characteristics, exhibiting different tissue distribution and developmental expression patterns, and responding differently to thyroid status and inhibitors (1).

Differentiated thyroid carcinomas, papillary and follicular, are derived from follicular thyroid cell even though the molecular events towards papillary thyroid carcinoma (PTC) formation appear to be different from those of follicular thyroid carcinoma (FTC) (2). However differentiated thyroid neoplasias generally retain many of the normal epithelial thyroid cells biochemical features, various degrees of abnormalities have been demonstrated in the expression of major proteins involved in the complex machinery of thyroid hormone synthesis. Different studies have shown decreased expression of thyroid-specific genes, such as the Na⁺/I⁻ symporter (NIS), thyroglobulin (Tg), TSH receptor (TSH-R) and thyroid peroxidase (TPO) in poorly differentiated and its absence in undifferentiated tumors (3-8). D1 and D2 are both highly expressed in normal and stimulated human thyroid gland. D1 transcripts appear to be relatively constitutively expressed while D2 varies more closely with the degree of human thyroid stimulation (9). Old data obtained from studies with enzyme activity in human thyroid tumors have suggested that 5'-deiodination is conserved in differentiated thyroid neoplasia (10). However, recently, decreased D2 mRNA and activity have been demonstrated in papillary thyroid carcinoma, suggesting that it could be associated with malignant transformation of thyroid follicular cell (11).

In the present study we have determined the D1 and D2 expression patterns in papillary and follicular thyroid carcinomas. We demonstrated a consistent and

remarkable reduced expression of both transcripts in PTC. In follicular lesions, cold adenoma or carcinoma, no significant difference in D1 and D2 mRNA levels was observed. Furthermore, we showed that D1 and D2 genes are expressed in medullary thyroid carcinoma (MTC), a parafollicular C cells thyroid tumor.

Materials and Methods

Patients

Samples of thyroid tumor (multinodular goiter, n = 10; follicular adenoma, n = 4; follicular carcinoma, n = 3; papillary carcinoma, n = 7; medullary carcinoma, n = 6) were collected from 30 consecutive unselected patients attending the Endocrine or the Head and Neck Surgery Divisions at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Surgery was independently indicated by attending physicians based on clinical indications. Tissues obtained at surgery were immediately frozen and stored until analysis. Tumors were histologically classified according to WHO recommendations (12). Serum TSH was measured with a double antibody–sensitive assay (Immulite, Diagnostic Products). The information obtained from the study did not influence or affect the patients' diagnosis or treatment. The Ethics Committee at the Hospital approved the study protocol, and all patients gave their informed consent.

Tissue preparation and RNA isolation

Thyroid tissues were obtained from both tumor and adjacent normal tissue at the time of surgery. Samples of the dominant nodule were collected in multinodular gland. Each tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 70° C until RNA preparation. Total RNA was isolated from 50 - 100 mg of thyroid tumor and surrounding nontumor tissues using TRIZOL[®] reagent (Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY,USA) according to the manufacture's instructions. The purity and integrity of the total RNA was assessed by UV spectrophotometry (GeneQuant II[®], Amersham Pharmacia Biotech) and denaturing agarose gel electrophoresis (visual presence of sharp 28S and 18S bands).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A semi-quantitative RT-PCR technique was used to determine the expression levels of D1 and D2 genes in RNA samples isolated from thyroid tissues. RT-PCR was performed using the Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen™ Life Technologies Inc., NY, USA) with 3 µg of total RNA as a template. Specific oligonucleotides derived from the coding region of published sequences of human D1 (5'-AAGAGGCTCTGGGTGCTCTTGG-3' and 5'-GGTTCTGGTGATTTCTGATGTC-3') and D2 (5'-ACTCGGTCATTCTGCTCAAG-3' and 5'-GAGAACTCTTCCACCAGTTTG-3') genes were used to prime target cDNA, resulting in a predicted 498 and 368 bp products, respectively (13,14). Human β₂-microglobulin primers set (5'-ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG-3' and 5'-AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC-3'), that generated a 623 bp product, was used as an internal control. PCR was performed separately for D1 and D2, that were co-amplified with β₂-microglobulin within the same reaction in order to evaluate inter-sample variation in cDNA contents and PCR efficiency. The PCR reactions included 0.5 and 1 µl of RT products for D1 and D2 amplification, respectively, and were carried-out with Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies Inc., NY, USA) in a final 50 µl volume. The amplification profile was an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 94°C for 1 min, annealing at 58°C (D1) or 60°C (D2), and extension at 72°C for 2 min. Twenty-five amplification cycles were used for D1 and thirty for D2, with a final additional extension step at 72°C for 4 min. The β₂-microglobulin primers were included after the 5th cycle for D1 and 10th cycle for D2. RT-PCR reactions without cDNA samples were carried-out as negative controls. All reactions were performed in duplicate. After amplification, 10 µl of the PCR products were analyzed on a 1.5 % ethidium bromide agarose gel and the intensity of each band was determined by optic densitometry (arbitrary units) (ImageMaster® VDS, Amersham Pharmacia Biotech). Finally, D1 and D2 band intensities were normalized against the corresponding values of the β₂-microglobulin band intensity.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD unless otherwise specified. To compare the mRNA levels of D1 and D2 genes in tumoral and corresponding surrounding tissue, paired Student's t- test was applied. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients

Table 1 shows the clinical and pathological characteristics of all patients studied. The clinical stage was determined by TNM system (15).

Expression of D1 and D2 mRNAs in tumors derived from follicular thyroid cell

Mean and median arbitrary unit values obtained by RT-PCR analysis for surrounding tumor tissues did not vary significantly, indicating that there is no wide variations in the expression of D1 and D2 genes in normal thyroid tissue (P= 0.262 and P= 0.766, respectively).

Figure 1 shows D1 and D2 mRNA levels in samples of PTC. The expression of both D1 and D2 genes were significantly decreased in tumor tissue when compared to surrounding normal tissue (P= 0.016 and P= 0.003, respectively) (Fig. 1A and B). A marked decreased in D1 and D2 expression were present in all samples analyzed, which consisted of different histological subtypes and clinical stages, including papillary microcarcinoma with less than 1.0 cm of diameter.

By contrast, we did not find significant differences neither in D1 nor in D2 mRNAs levels in follicular lesions, adenoma (P= 0.196 and P= 0.984, respectively) or carcinoma (P= 0.325 and P= 0.963, respectively), compared with normal surrounding tissue (Fig 2A and B). Since multinodular goiter and, in particular, goiter nodules, is currently considered to be a true thyroid neoplasm, we also analyzed D1 and D2 expression in the dominant cold nodule on iodine scintigraphy. There were not significant differences

in D1 or D2 gene expressions between nodules and corresponding surrounding tissues (2.73 ± 2.95 vs. 1.37 ± 0.88 , $P=0.128$ and 1.37 ± 1.30 vs. 0.95 ± 0.73 , $P=0.262$, respectively).

Determination of D1 and D2 mRNA levels in medullary thyroid carcinoma

We have extended our investigation by analyzing tumor samples from patients with medullary thyroid carcinomas (MTC), to determine D1 and D2 gene expressions in other malignant thyroid neoplasias. Expression of both D1 and D2 genes was detected in all MTC samples. The expression of D1 gene in C cell tumors, as measured by RT-PCR, overlaps with the mRNAs values detected in normal thyroid tissues ($P= 0.814$, Fig 3). The mean D2 mRNAs level was decreased in tumor samples, but did not reach statistical significance. ($P= 0.137$, Fig 3).

Discussion

In the present study, we analyzed D1 and D2 expression in normal and tumor thyroid samples by semi-quantitative RT-PCR. Our results demonstrated that D1 and D2 mRNA levels are markedly decreased in PTC compared to corresponding surrounding nontumor tissue. Although PTC is clinically heterogeneous, the D1 and D2 expression patterns showed remarkable consistency, and marked lower expression of both deiodinases was observed even in microcarcinomas. By contrast, no significant changes were observed on D1 and D2 expression in follicular lesions, neither adenoma nor carcinoma, multinodular goiter or medullary thyroid carcinoma.

Of the major forms of differentiated cancer derived from thyroid follicular cells, PTC is by far the most common. By contrast, FTC is now quite rare (16). The genetic events towards PTC formation appear to be different from those in FTC (2). The etiology and molecular biology of PTC is poorly understood. There is no recognizable histological precursor for PTC. Ret/PTC rearrangements may occur as initiating events in papillary carcinoma, although it appears that ret/PTC itself is not sufficient to evoke malignant transformation (17). On the other hand, current concepts of the molecular sequential changes involved in thyroid tumorigenesis suggest that FTC probably arises from benign adenomas (2,18). Although absolute proof of the follicular adenoma-transition is lacking,

the existence of intermediate phenotypes (i.e. minimally invasive follicular carcinomas) is consistent with this hypothesis.

Several studies have been focused in serial analysis of gene expression profile in differentiated thyroid carcinomas to identify novel thyroid genes and possible markers of thyroid cell differentiation. It has been demonstrated reduced expression of NIS gene in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors (3,5,6). Other studies have shown decreased expression of other thyroid-specific genes, such as TSH-R, Tg and TPO, in poorly differentiated and its absence in undifferentiated tumors (4,7,8). There are few data in the literature regarding deiodinases expression in thyroid neoplasms (10,11,19). Recently, differences in gene expression in PTC were addressed by microarray analysis technique. The authors reported a highly consistent profile of gene expression in PTC with underexpression of several important genes in thyroid follicular cell functions, among them D1 and D2 genes (20). Accordingly, in the present study, RT-PCR analysis showed a remarkable consistent reduced expression levels of both genes in a series of PTC samples, that included different histological subtypes and tumor stages. Interestingly, decreased D1 and D2 expression was detected even in small papillary cancer with less than 1 cm in diameter. This expression pattern contrast to what have been described for other genes in PTC, such as the TSH-R gene, that shows significantly lower expression in advanced than in early stages of disease (21, 22), and suggests that decrement of D1 and D2 expression might occur early in PTC cell dedifferentiation.

The reasons for the decreased D1 and D2 mRNA expression levels in the PTC are unknown. Changes in the expression levels of different genes are common in many cancers and may result from mutations in transcriptional factors, loss of cell differentiation during neoplastic transformation, or unregulated production due to disrupted control mechanisms (23,24,25). Decreased D1 activity and mRNA levels have been reported in renal clear cell carcinoma (26). In an opposite way, D2 mRNA levels remain normal or highly expressed in brain tumors and mesotelioma cell line (27,28), albeit cell dedifferentiation. An intriguing aspect of our findings is the remarkable similar expression patterns of D1 and D2 genes in PTC, since these genes show quite different regulatory features (1). Identification of the mechanism responsible for this finding may provide important insights into the regulatory pathways in thyroid transformed cells.

By contrast, we did not find any differences in D1 or D2 gene expression levels in follicular lesions, neither adenoma nor carcinoma, indicating distinct D1 and D2

expression profiles for papillary and follicular carcinomas. These results are interesting since they are in agreement with the current knowledge on the molecular events involved in epithelial thyroid cell dedifferentiation, which suggests specific pathways towards papillary or follicular neoplasias (2,18). Therefore, loss of deiodinase expression may be an early marker of cell transformation towards papillary cancer. In multinodular goiter, also a thyroid follicular cell derived neoplasia, a wide range of D1 and D2 expression in nodules and surrounding tissues were displayed. This is somewhat expected, because the characteristic heterogeneity hallmark of human multinodular goiter (29). A possible limitation of this study is that we did not analyze a number of follicular carcinoma samples sufficient to ensure that loss of D1 and D2 expression does not occur in this cancer. However the analysis of adenoma samples corroborates our data in same way, since this lesion is considered to be a precursor of follicular cancer, we believe that a larger number of follicular cancer samples should be analyzed.

D1 and D2 gene expression were detected in MTC, which was somewhat unexpected, since this cancer is originated from the thyroid parafollicular C cells that are not involved in thyroid hormone synthesis or metabolism. Although we can not ensure that D1 and D2 expression levels was not changed in medullary cancer because normal C cells were not available for corresponding analysis, no significant differences were observed in D1 and D2 mRNA levels in tumor when compared with surrounding nontumor tissue.

In conclusion, we demonstrated a consistent and remarkable decreased expression of D1 and D2 gene transcripts in papillary thyroid carcinoma. In follicular lesions, cold adenoma or carcinoma, no significant differences in mRNA levels were observed. Furthermore, we showed that D1 and D2 are expressed in medullary thyroid carcinoma, a tumor of the thyroid parafollicular C cells. Our findings suggest that reduced D1 and D2 expression levels might be an early and discrete event in thyroid follicular cells towards papillary carcinoma dedifferentiation.

References:

1. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
2. Fagin JA. Molecular pathogenesis of tumors of thyroid follicular cells. In: Fagin JA (ed). *Thyroid cancer*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998; 59-83.
3. Ryu KY, Senokozlieff ME, Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporter. *Thyroid* 1999; 9: 405-409.
4. Otha K, Endo T, Onaya T. The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 1148-1153.
5. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2493-2496.
6. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na⁺ / I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3228-3234.
7. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, Arime I, Yamamoto S, Kurebayashi J, Shimozuma K. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 340-346.
8. Brabant G, Maenhaut C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, Mühlen A, Vassart G, Dumont JE. Human thyrotropin receptor gene: expression in

- thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 82: R7-R12.
9. Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 1996; 98:962-968.
 10. Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Imura H. Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52:1211-1217.
 11. Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 2001; 142: 2961-2967.
 12. Hedinger CE, Williams ED, Sobin LH. Histological typing of thyroid tumors. In: WHO, International histological classification of tumours. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1988; 5-6.
 13. Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1133-1139.
 14. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St.Germain DL, Galton VA. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 26786-26789.
 15. American Joint Committee on Cancer: Head and neck tumors. Thyroid gland. In: Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH, Eds. Manual for staging of cancer. Philadelphia: J.B. Lippincott; 53-54.
 16. Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1447-1463.

17. Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T, Iwamoto KS, Seyama T. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1997; 15: 1455-1460.
18. Suárez HG. Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 531-546.
19. Sugawara M, Lau R, Wasser HL, Nelson AM, Kuma K, Hershman M. Thyroid T4 5'-deiodinase activity in normal and abnormal human thyroid glands. *Metabolism* 1984; 33: 332-336.
20. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 15004-15049.
21. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Komaki K, Monden Y. Heterogeneous distribution of thyrotropin receptor messenger ribonucleic acid (TSH-R mRNA) in papillary thyroid carcinomas detected by *in situ* hybridization. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 259-267.
22. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Masuda E, Kitaichi M, Komaki K, Uyama T, Monden Y. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Br J Cancer* 1997; 76: 594-599.
23. Latchman DS. Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 28-33.
24. Eggo MC, Hopkins JM, Franklyn JA, Johnson GD, Sanders DS, Sheppard MC. Expression of fibroblast growth factors in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1006-1011.
25. Ivan M, Bond JA, Prat M, Comoglio PM, Wynford-Thomas D. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 2417-2423.

26. Pachucki J, Ambroziak M, Tanski Z, Luczak J, Nauman J, Nauman A. Type I 5'-iodothyronine deiodinase activity and mRNA are remarkably reduced in renal clear cell carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 253-261.
27. Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M. Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4403-4406.
28. Curcio C, Baqui MMA, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *J Biol Chem* 2001; 276: 30183-30187.
29. Aeschimann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, Studer H. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 846-851.

Table 1 – Clinical characteristics of patients with thyroid tumors.

Patient no.	Sex / age (yr.)	TSH ^a	Histology	Size (cm)	Stage ^b	Invaded organ
Papillary carcinomas						
1	M/56	0.44	Classic type	4.0	3	Conjunctive tissue and skeletal muscle of neck
2	M/35	1.76	Classic type; multifocal; bilateral	0.5	1	Cervical lymph nodes and fibroadipose tissue
3	F/30		Classic type	1.0	1	
4	F/29	0.93	Classic type	3.2	1	Cervical lymph nodes
5	F/52	0.02	Classic type	1.2	2	
6	F/22		Classic type	1.0	1	Cervical lymph nodes
7	F/10	3.14	Diffuse sclerosing variant		2	Cervical lymph nodes and pulmonary metastases
Non-toxic follicular adenomas						
8	M/37			2.7		
9	F/41	1.00		2.0		
10	M/47	2.95		3.8		
11	F/69	1.56		3.0		
Follicular Thyroid Carcinomas						
12	F/28	1.12		5.0	1	
13	F/23	0.83		2.5	1	
14	F/66	5.81		2.5	2	
Multinodular Goiters						
15	F/67	0.57		3.3		
16	F/35	0.84		2.9		
17	F/51	2.10		7.0		
18	F/40	0.88		4.0		
19	F/48	2.40		1.4		
20	F/46	0.49		2.4		
21	F/54	0.32		3.1		
22	F/60	2.40		3.3		
23	F/51	0.07		3.1		
24	F/56	0.18		3.0		
Medullary Thyroid Carcinoma						
25	F/22	0.64	Multifocal; C-cell hyperplasia	1.3	2	
26	F/54	0.87		2.2	2	
27	F/50	2.55		5.0	2	
28	F/33	2.19	Multifocal	1.3	2	
29	M/15	1.72	Multifocal; C-cell hyperplasia	1.2	2	
30	F/37	0.95	Multifocal; C-cell hyperplasia	3.0	3	Cervical lymph nodes

- ^a TSH reference: 0.4 - 4.0 mUI/L.

^b Stage according to the TNM system (15).

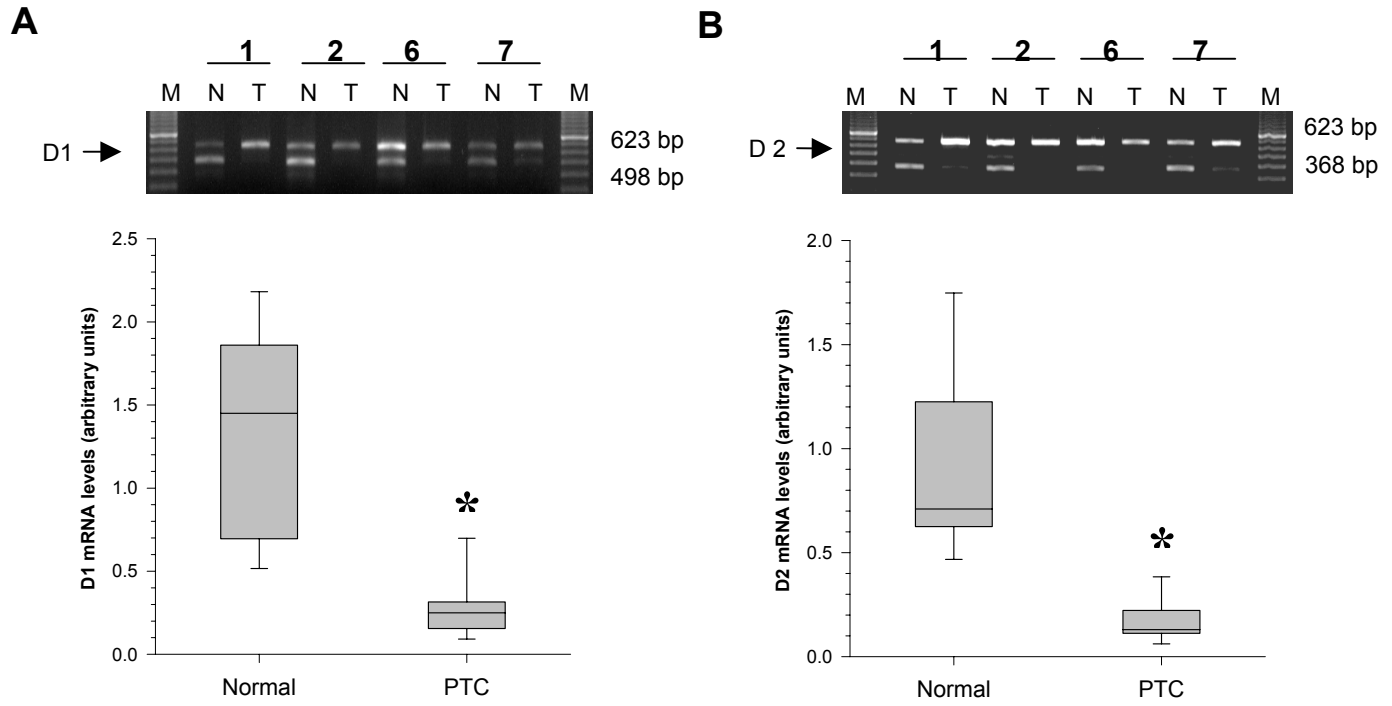


FIGURE 1

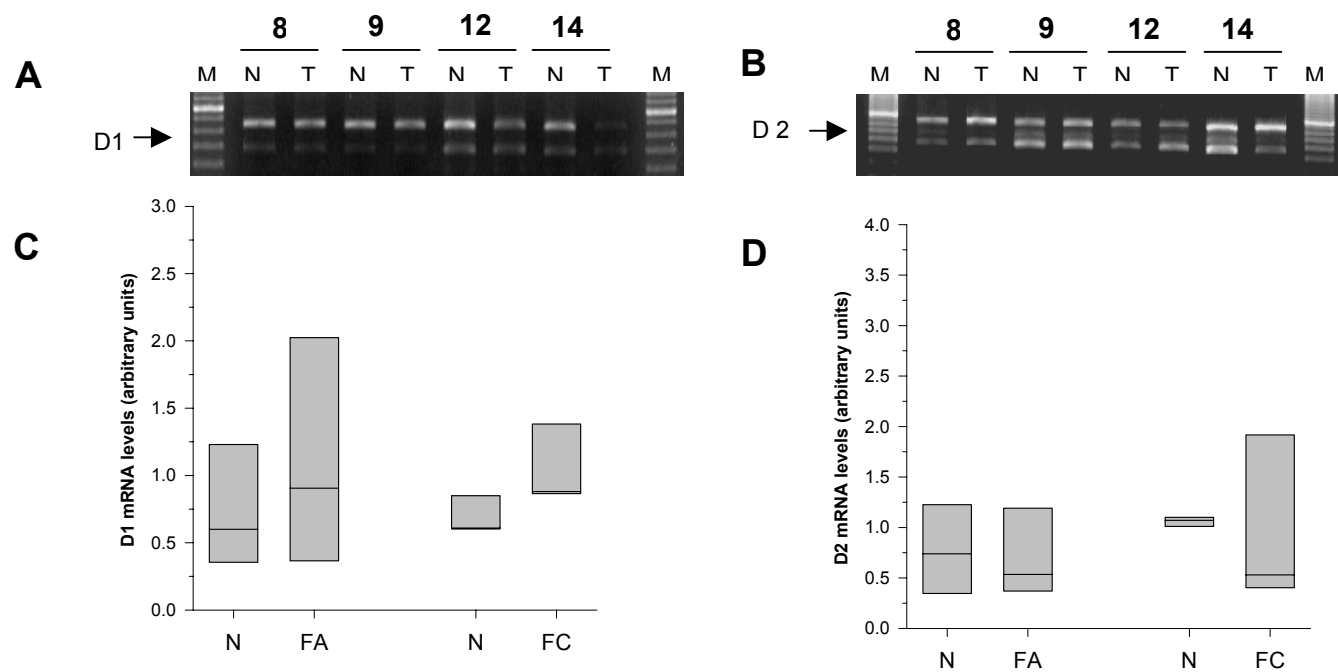


FIGURE 2

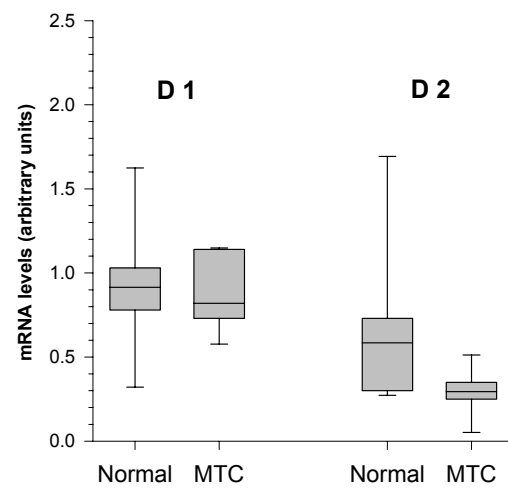
**FIGURE 3**

Fig. 1. D1 and D2 gene expression in papillary thyroid carcinoma (PTC). **A, B.** An illustrative semi-quantitative RT-PCR of D1 (A) and D2 (B) products in tumor (T) and corresponding surrounding tissue (N) from cases 1, 2, 6 and 7 (table 1) on 1.5% agarose gel stained by ethidium bromide. **C, D.** Box plots for D1 (C) and D2 (D) mRNA levels in normal tissue and PTC. The box represents the interquartile range that contains 50% of the values. The whiskers demonstrate the highest and the lowest values. No outliers were found. A line across the box indicates the median. Results are expressed in relation to β_2 -microglobulin optical density (arbitrary units, see material and methods). * $P < 0.02$ vs. normal tissue.

Fig. 2. D1 and D2 gene expression in follicular adenoma (FA) and follicular carcinoma (FC). **A, B.** An illustrative semi-quantitative RT-PCR of D1 (A) and D2 (B) products in tumor (T) and corresponding surrounding tissue (N) from cases 8, 9, 12, and 14 (table 1) on 1.5 % agarose gel stained by ethidium bromide. **C, D.** Box plot for D1(C) and D2 (D) mRNA levels in normal tissue and FA or FC. The box represents the interquartile range that contains 50% of values. A line across the box indicates the median. Results are expressed in relation to β_2 -microglobulin optical density (arbitrary units, see material and methods).

Fig.3. Box plots for D1 and D2 mRNA levels in normal tissue (N) and medullary thyroid carcinoma (MTC). The box represents the interquartile range that contains 50% of the values. The whiskers demonstrate the highest and the lowest values. No outliers were found. A line across the box indicates the median. Results are expressed in relation to β_2 -microglobulin optical density (arbitrary units, see material and methods).